CITOMETRÍA DE FLUJO EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS

Curso de Aplicaciones clínicas de la Citometria de

Dra. Viviana Novoa.

Laboratorio de Inmunología.

Unidad de Inmunología e Histocompatibilidad.

Hospital General de Agudos Dr. Carlos G. Durand.

C.A.B.A. Argentina

Las leucemias agudas son enfermedades neoplásica que resultan de una proliferación clonal no controlada de células precursoras anormales (blastos) en sangre periférica, médula ósea u otros tejidos.

Presentación clínica:

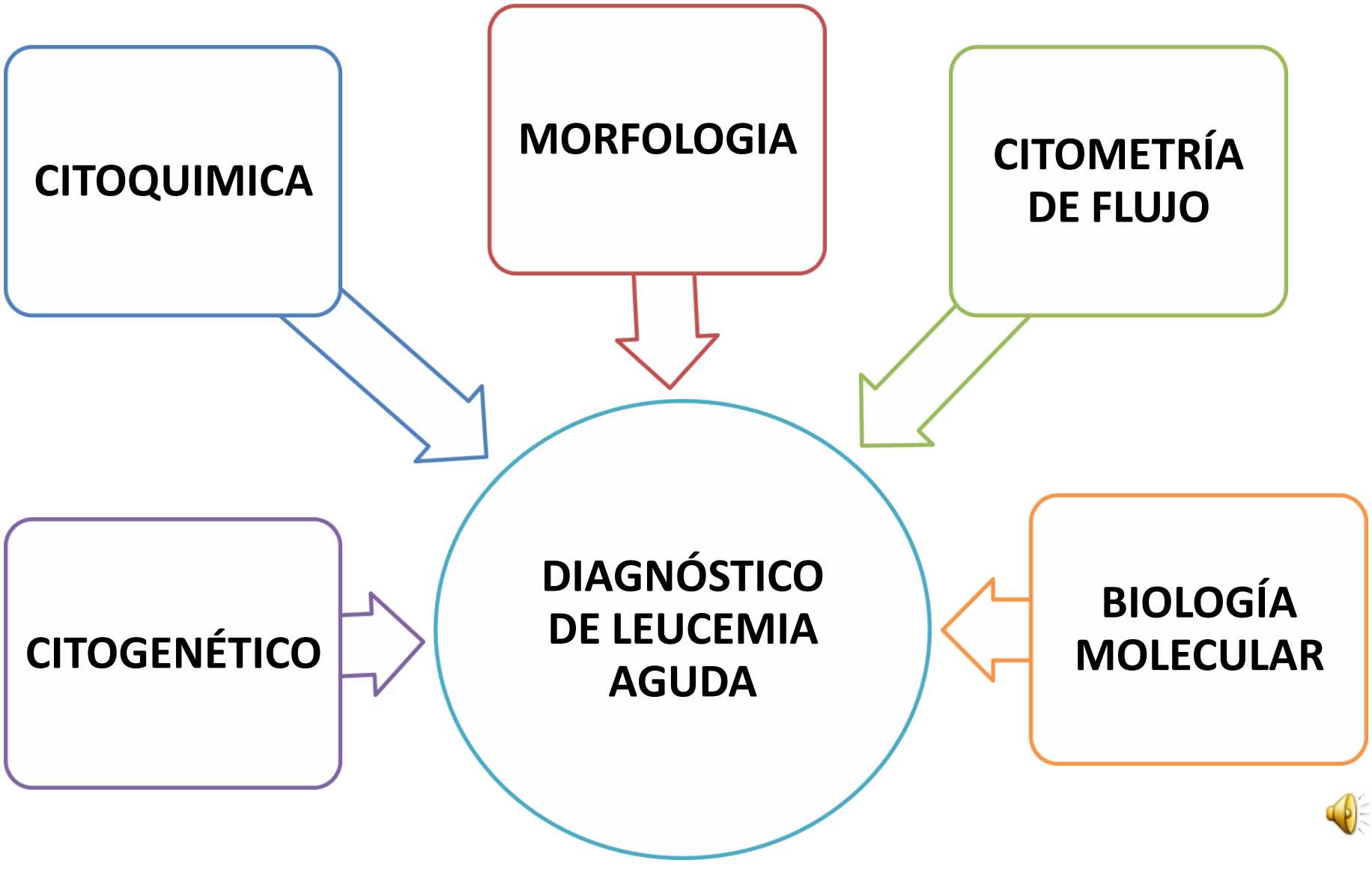
- Síndrome febril.
- Astenia.
- Adenopatías.
- Organomegalia.
- Anemia y/ o plaquetopenia.
- Leucocitosis o leucopenia
- Sangrado.
- Compromiso del SNC.

Heterogeneidad clínica, morfológica y genética y puede involucrar uno o más linajes hematopoyéticos.

Requisito para el diagnóstico: presentar ≥ 20% de blastos o < 20% de blastos asociados a anormalidades cromosómicas (WHO).

CLASIFICACIÓN

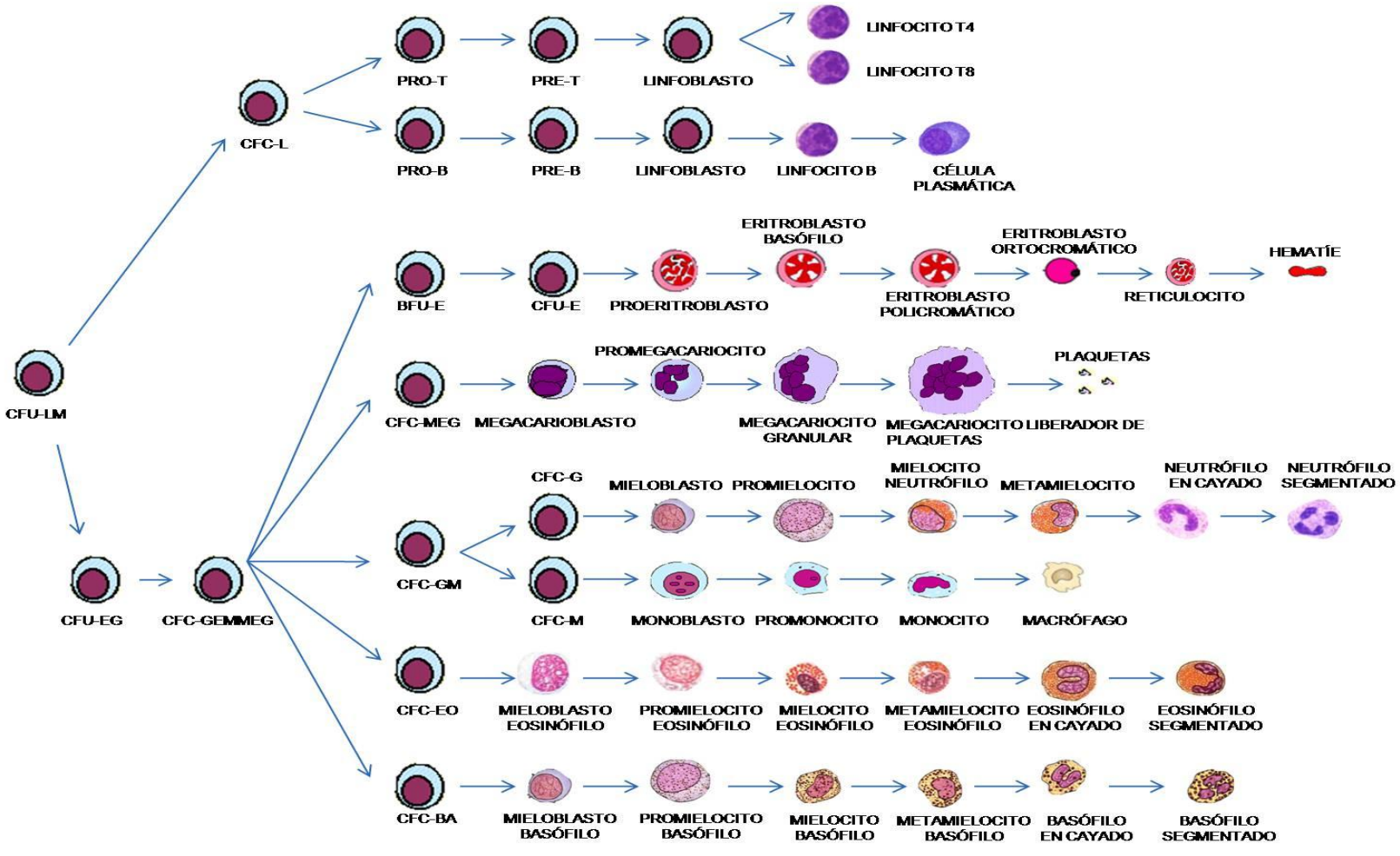
FAB (1976 y 1985)	Criterios morfológicos y citoquímicos.
EGIL (1995)	Introduce criterios de inmunofenotipo.
WHO (2008- 2017)	Criterios morfológicos, citoquímicos, inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares

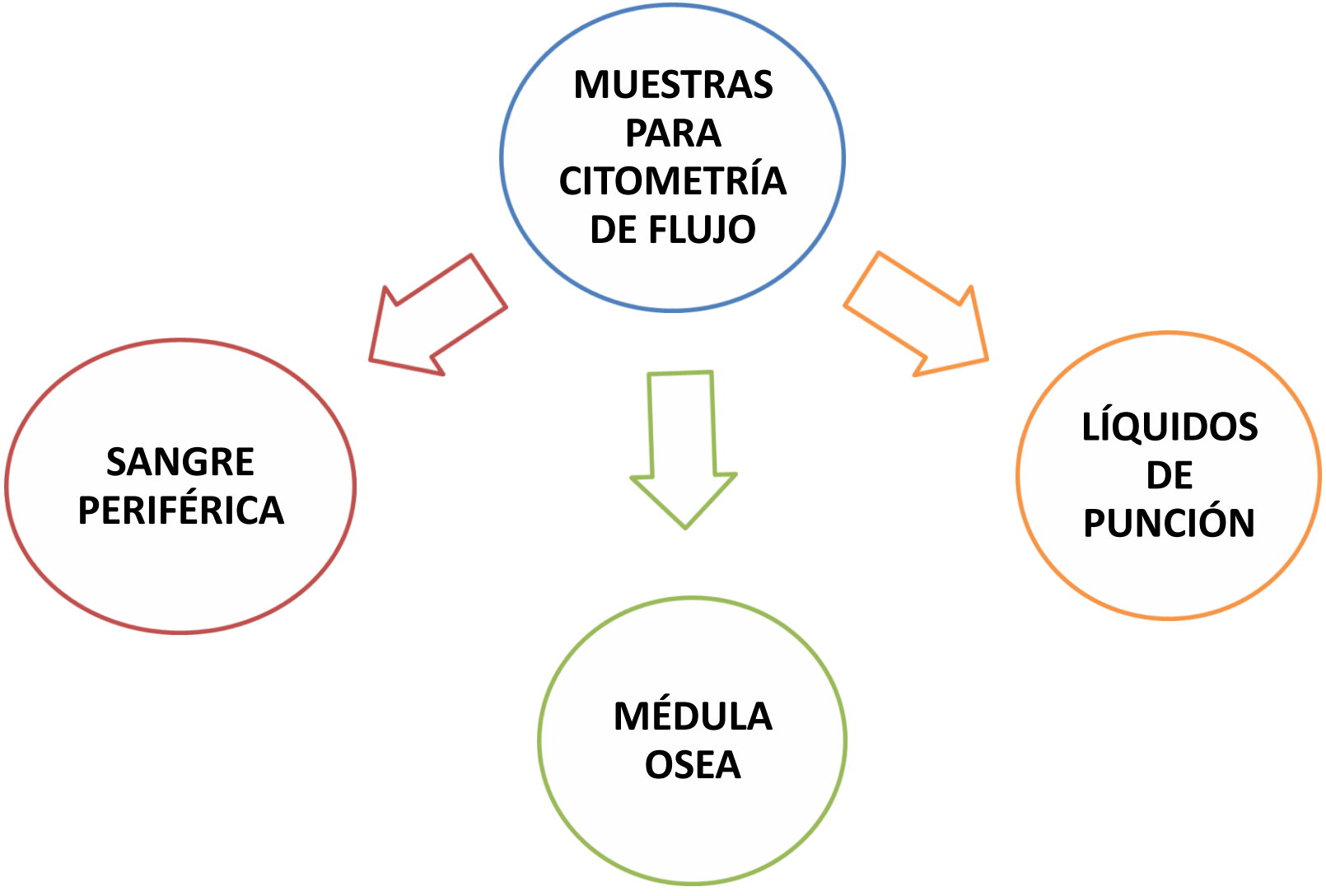

CITOQUIMICA
MORFOLOGIA
CITOMETRÍA DE FLUJO
CITOGENÉTICO
DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA AGUDA
BIOLOGÍA MOLECULAR

LEUCEMIAS AGUDAS: CITOMETRÍA DE FLUJO

- ❑ Diagnóstico.
- ❑ Pronóstico.
- ❑ Monitoreo del tratamiento.

HEMATOPOYESIS




MUESTRAS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO
SANGRE PERIFÉRICA
MÉDULA OSEA
LÍQUIDOS DE PUNCIÓN

IMPORTANTE

CALIDAD DE LA MUESTRA

PROBLEMAS MÁS COMUNES

- Hemodilusión.
- Presencia de coágulos o hemólisis.
- LCR con contaminación hemática.
- Viabilidad celular.
- Identificación de la muestra.

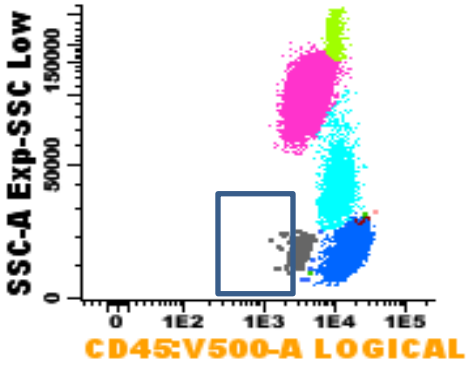
EN EL ESTUDIO DE LEUCEMIAS AGUDAS,

LA CITOMETRÍA DE FLUJO PERMITE:

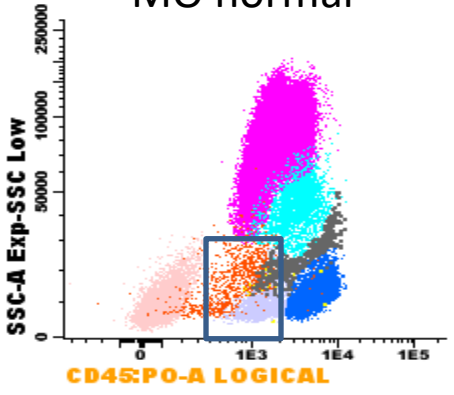
- Diferenciar poblaciones de células neoplásicas (blastos), de células normales.
- Caracterizar el linaje celular y el estadio de maduración de las células neoplásicas.
- Determinar los inmunofenotipos anormales presentes en las células neoplásicas.
- Cuantificación de los blastos.

Diferenciar blastos de células normales

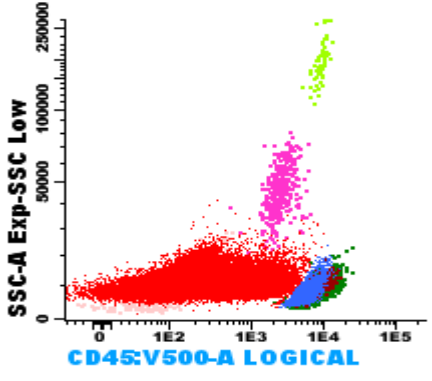
SP normal

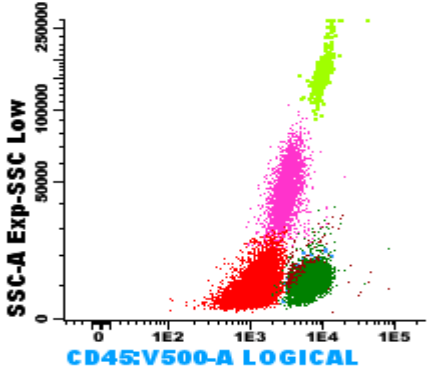


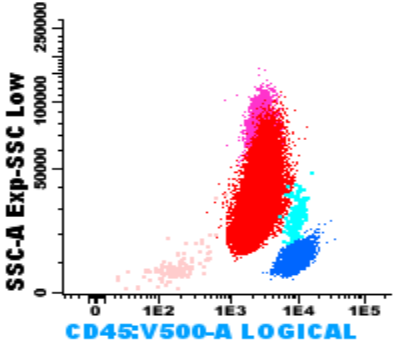
MO normal



Granulocitos
Eosinófilos
Basófilos
Monocitos
Cél.dendríticas.
Linfocitos
Precursores B
Precursores M
Cél eritroide nucleadas
Blastos







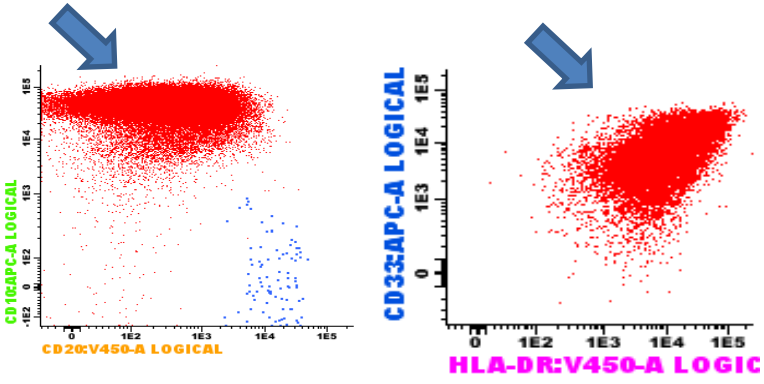
Caracterizar linaje celular, estadio de maduración y fenotipos aberrantes.

- **Linaje B**: CD19, CD79a, CD10, CD20, CD22, CD24, CD81, μic, κ, λ,
- **Linaje T**: CD3, CD2, CD7, CD5, CD4, CD8, CD56, CD99, TCRαβ, TCRγδ.
- **Linaje mielomonocítico**: MPO, CD13, CD33, CD15, CD117, CD64, CD14, CD11b, IREM2, CD35, CD36.
- **Linaje eritroide**: CD105, CD71, CD36, CD235a.
- **Linaje megacariocítico**: CD41, CD42, CD61.
- **Linaje células dendríticas**: CD123, CD36, CD11c.
- **No específicos de linaje**: CD45, CD34, DR, CD38, TDT.

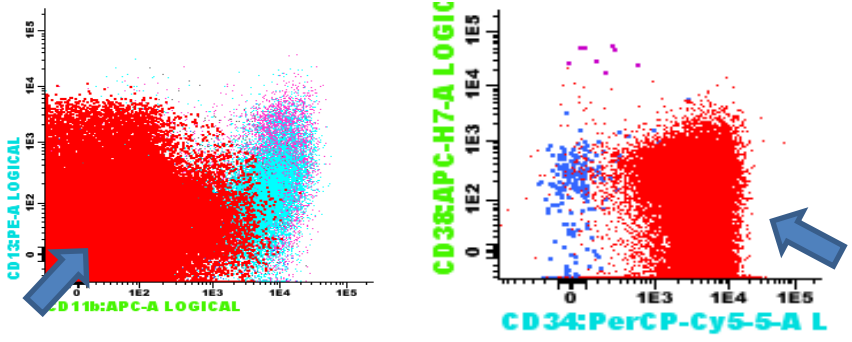
ESTUDIO DE ABERRACIONES INMUNOFENOTÍPICAS

- Alteración en la expresión: Aumento, disminución o pérdida de expresión de la molécula evaluada.
- Infidelidad de línea: Expresión de Ags de otro linaje.
- Asincronismo madurativo: Expresión antigénica de distintos estadios madurativos.
- Inmunofenotipos ectópicos: En zonas que no están normalmente.
- Alteración en el FSC/SSC.
- Clonalidad de cadenas livianas de Ig.

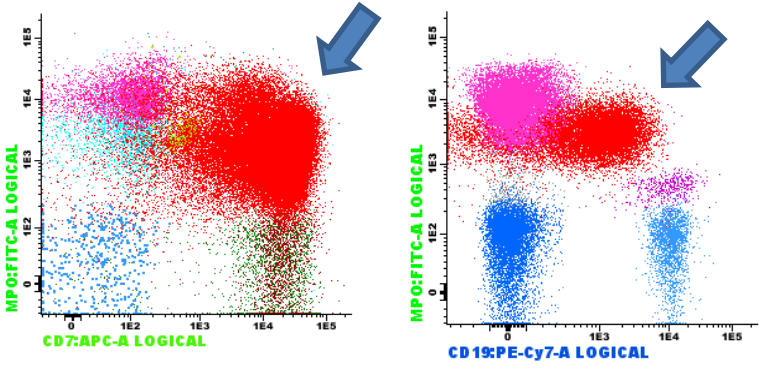
Sobre-expresión



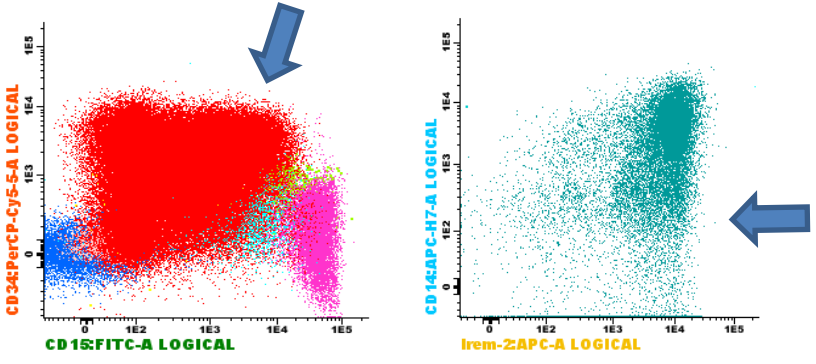
Disminución o pérdida de expresión



Infidelidad de linaje



Asincronismo madurativo



CRITERIO PARA EL DISEÑO DE PANELES

- Debe permitir distinguir las principales poblaciones celulares presentes en la muestra.
- Debe ser suficientemente amplio para identificar la presencia de células anormales (blastos) y poder caracterizarlas en forma completa.
- Tener en cuenta las combinaciones que proporcionan mayor información.
- Tipo de reactivo: Sensibilidad del fluorocromo. Clon del Ac monoclonal. Viabilidad del reactivo.
- Tener en cuenta la correlación fenotipo-genotipo.
- Diseño de un panel de screening para identificar el linaje de la célula leucémica y paneles para la clasificación de la leucemia aguda.

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 72B:S14–S22 (2007)

2006 Bethesda International Consensus Recommendations on the Immunophenotypic Analysis of Hematolymphoid Neoplasia by Flow Cytometry: Optimal Reagents and Reporting for the Flow Cytometric Diagnosis of Hematopoietic Neoplasia

Brent L. Wood,[1]* Maria Arroz,[2] David Barnett,[3] Joseph DiGiuseppe,[4] Bruce Greig,[5] Steven J. Kussick,[6] Teri Oldaker,[7] Mark Shenkin,[8] Elizabeth Stone,[9] and Paul Wallace[10]

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 94B:82–93 (2018)

Original Article

AIEOP-BFM Consensus Guidelines 2016 for Flow Cytometric Immunophenotyping of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia

Michael N. Dworzak,[1]* Barbara Buldini,[2] Giuseppe Gaipa,[3] Richard Ratei,[4] Ondrej Hrusak,[5] Drorit Luria,[6] Eti Rosenthal,[7] Jean-Pierre Bourquin,[8] Mary Sartor,[9] Angela Schumich,[1] Leonid Karawajew,[10] Ester Mejstrikova,[5] Oscar Maglia,[3] Georg Mann,[1] Wolf-Dieter Ludwig,[4] Andrea Biondi,[3] Martin Schrappe,[11] and Giuseppe Basso,[2] on behalf of the International-BFM-FLOW-network

Leukemia (2011) 25, 567–574
© 2011 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0887-6924/11
www.nature.com/leu

REVIEW

Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10

MC Béné[1], T Nebe[2], P Bettelheim[3], B Buldini[4], H Bumbea[5], W Kern[6], F Lacombe[7], P Lemez[8], I Marinov[9], E Matutes[10], M Maynadié[11], U Oelschlagel[12], A Orfao[13], R Schabath[14], M Solenthaler[15], G Tschurtschenthaler[16], AM Vladareanu[5], G Zini[17], GC Faure[1] and A Porwit[18]

Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 94B:542–547 (2018)

Brief Communications

Panel Proposal for the Immunophenotypic Diagnosis of Hematological Malignancies. A Collaborative Consensus from the Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL)

Collective Publication

Leukemia (2012) 26, 1908–1975
© 2012 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0887-6924/12
www.nature.com/leu

Open

ORIGINAL ARTICLE

EuroFlow antibody panels for standardized *n*-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes

JJM van Dongen[1], L Lhermitte[2], S Böttcher[3], J Almeida[4], VHJ van der Velden[1], J Flores-Montero[4], A Rawstron[5], V Asnafi[2], Q Lécrevisse[4], P Lucio[6], E Mejstrikova[7], T Szczepański[8], T Kalina[7], R de Tute[5], M Brüggemann[3], L Sedek[8], M Cullen[5], AW Langerak[1], A Mendonça[6], E Macintyre[2], M Martin-Ayuso[9], O Hrusak[7], MB Vidriales[10] and A Orfao[4] on behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708)

CITOMETRÍA DE FLUJO

SOSPECHA CLÍNICA

Leucocitosis, citopenia, blastos en el hemograma, síntomas y signos clínicos sugerente de leucemia aguda

PANEL DE SCREENING

CD45 CD34 MPO CD19 CD79a CD7 CD3ic CD3sup

PANELES DE CLASIFICACIÓN

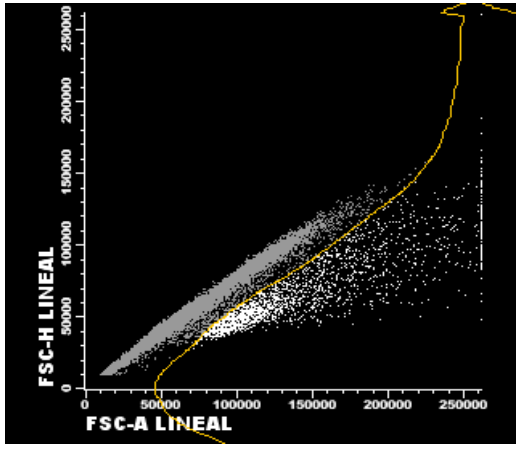
Leucemia de precursores B
Leucemia de precursores T
Leucemias mieloides

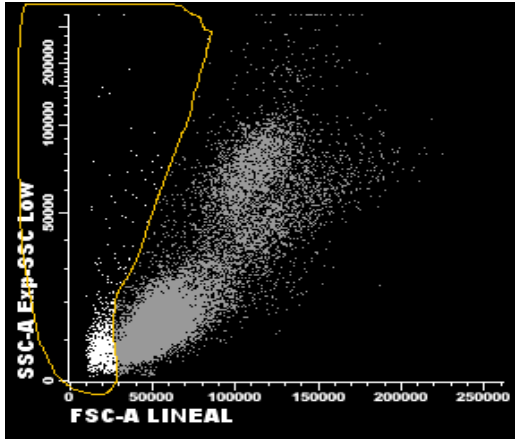
PANEL DE SCREENING

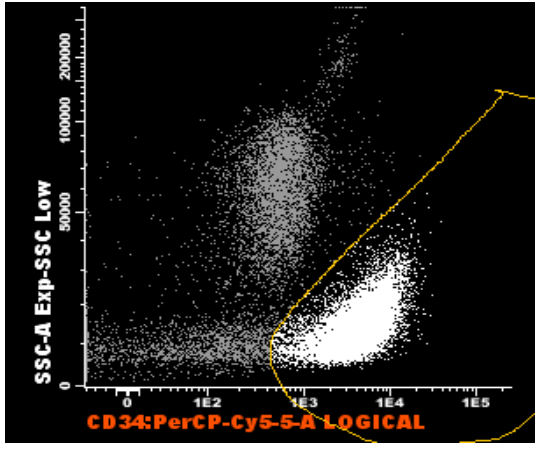
EuroFlow: ALOT (8 colores)

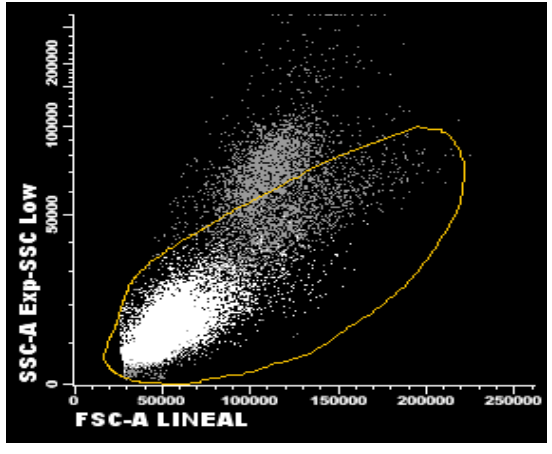
PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
CyCD3	CD45	CyMPO	CyCD79a	CD34	CD19	CD7	SmCD3

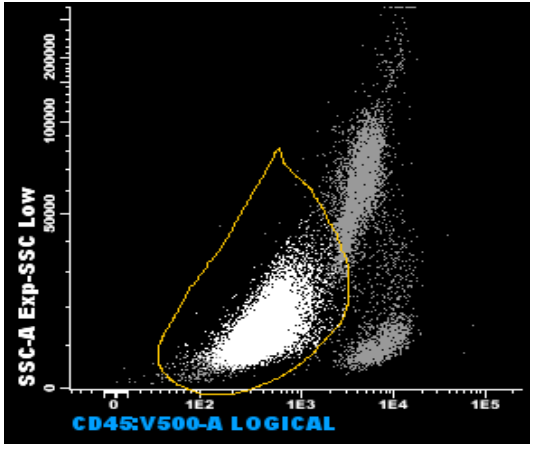
CD45	→	Panleucocitario
CD34	→	Inmadurez
MPO	→	Linaje mieloide
CD19 y CD79a	→	Linaje linfoide B
CyCD3, SmCD3	→	Linaje linfoide T


FSC-H LINEAL
0
50000
100000
150000
200000
250000
FSC-A LINEAL


SSC-A Exp-SSC Low
0
50000
100000
200000
FSC-A LINEAL


SSC-A Exp-SSC Low
0
50000
100000
200000
0
1E2
1E3
1E4
1E5
CD34:PerCP-Cy5-5-A LOGICAL

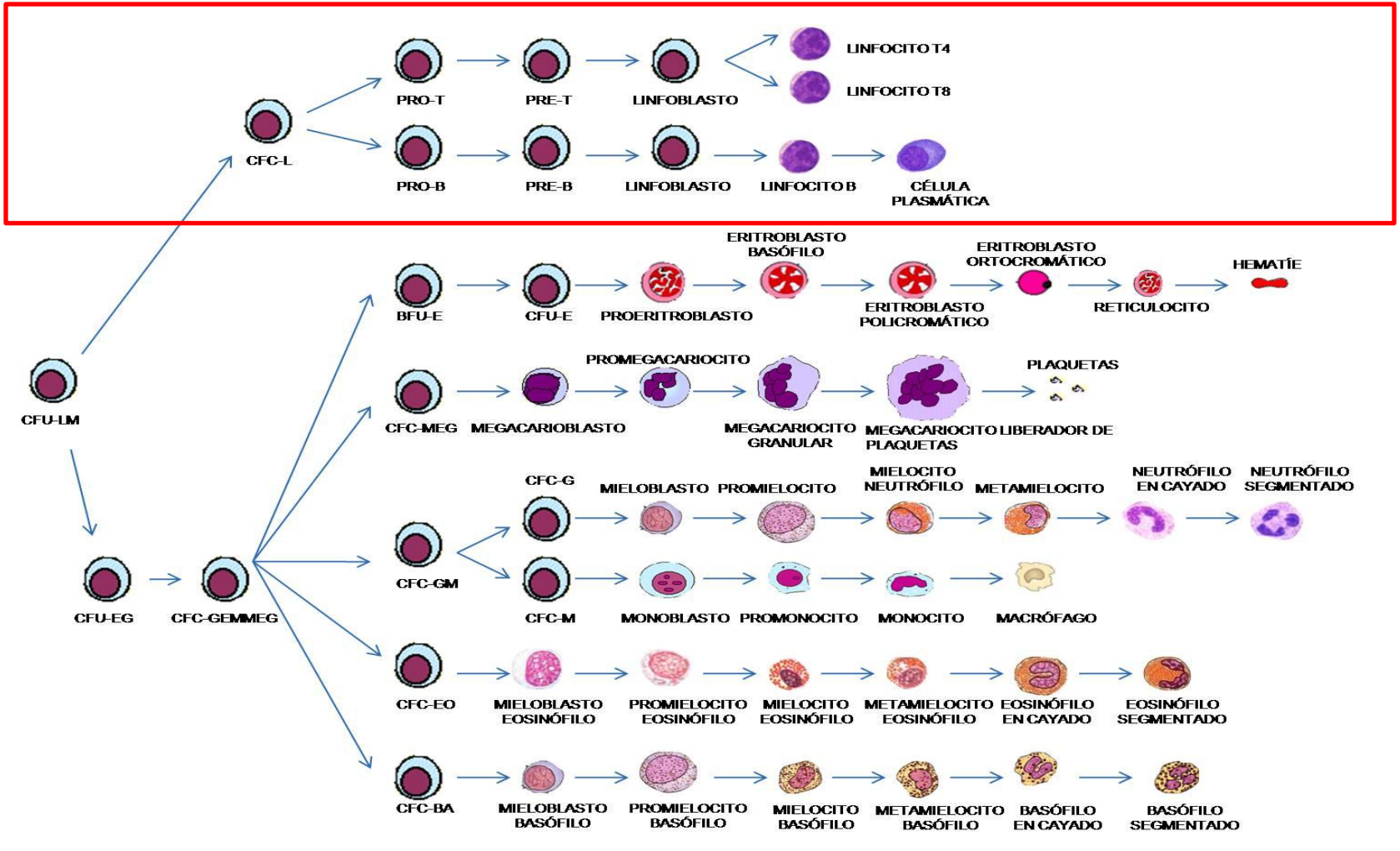

SSC-A Exp-SSC Low
0
50000
100000
200000
FSC-A LINEAL


SSC-A Exp-SSC Low
0
50000
100000
200000
0
1E2
1E3
1E4
1E5
CD45:V500-A LOGICAL

Leucemia Linfoblástica Aguda

- Son más frecuente en niños que adultos. Representan el 75%-80% de las Leucemias Agudas en edad pediátrica.
- Tienen una distribución bimodal. Primer pico en menores de 20 años y segundo pico en mayores de 45 años.
- Inmunofenotipo de linaje B o de linaje T.
- Frecuente hiperdiploidía.
- Compromiso del SNC.
- Distintos grupos de riesgo y pronóstico.

HEMATOPOYESIS



Clasificación EGIL de las LLA de precursores B

cCD22+, cCD79a+, CD19+, HLA-DR+

- Pro B: CD10 -
- Común: CD10+, cad μ -
- Pre B: CD10+/-, cad μ +, Ig Sup -
- B madura:CD10+/-, Ig Sup+ (κ ó λ)

Clasificación EGIL de las LLA de precursores T

cCD3+, CD7+, TCR+/-, HLA-DR-

- Pro T: CD2 -, CD5 - , CD8 -
- Pre T: CD2+,y/o CD5+ y/o CD8+
- Intermedia: CD1a+,CD4+/CD8+,CD3+/-
- T madura: CD1a-, CD3+ , TCR $\alpha\beta/\gamma\delta$

Clasificación de la WHO- Neoplasias Precursoras Linfoides

Leucemia/ linfoma linfoblástico B con recurrentes anormalidades genéticas

LLA-B con t(9;22)(q24;q11.2); BCR-ABL1	CD19(+) CD10(+) CD34(+ homogéneo) CD38(+ heterogéneo) TDT(+) CD13(+d) más frecuente o CD33(+d) CD117(-) CD25(+).
LLA-B con t(v;11q23.3), rearreglo KMT2A (MLL)	CD19(+) CD10(-) CD24(-) CD15(+) con fenotipo pro-B. NG2(+) CD65(+) CD34(+).
LLA-B con t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)	CD19(+) CD10(++) CD34(+ bimodal) CD9(-)DR(+++) CD20(-/+d) CD45(-/+d) CD66c(-) CD13(+) frecuentemente.
LLA-B con hyperdiploidia	CD19(+) CD10(+) CD34(+) CD45(-)
LLA-B con hipodiploidia	CD19(+) CD10(+) y fenotipo de precursor B sin otras características distintivas.
LLA-B con t(5;14)(q31.1;q32.1); IL3-IGH	CD19(+) CD10(+). Pocos número de blastos linfoides B con presencia de eosinofilia.
LLA-B con t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1	CD19(+) CD10(+) μ ic(+) con fenotipo pre-B o CD9(+++) y CD34(-). No todas las pre-B tienen esta alteración.
LLA-B BCR-ABL1 like	CD19(+) CD10(+), sin inmunofenotipo específico
LLA-B con iAMP21	Sin inmunofenotipo específico

Clasificación de la WHO- Neoplasias Precursoras Linfoides

Leucemia/ linfoma linfoblástico B sin otra caracterización (NOS)

LLA-B proB	CD19(+) CD79a(+)CD22c(+) CD22(+) TdT(+) CD10(-)
LLA-B común	CD19(+) CD79a(+)CD22c(+) CD22(+) CD10(+)
LLA-B pre-B	CD19(+) CD79a(+) CD22(+) μ ic (+)

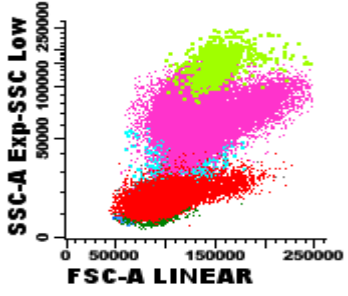
Clasificación de la WHO- Neoplasias Precursoras Linfoides

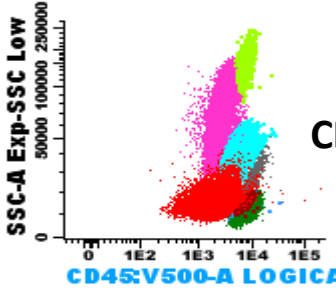
Leucemia/ Linfoma linfoblástico T	LLA-T pro-T	CD3c(+) CD7(+) CD2(-) CD1a(-) CD34(+/-) CD4(-) CD8(-)
	LLA-T pre-T	CD3c(+) CD7(+) CD2(+) CD1a(-) CD34(+/-) CD4(-) CD8(-)
	LLA-T cortical	CD3c(+) CD7(+)CD2(+) CD1a(+) CD34(-) CD4(+) CD8(+)
	LLA-T medular	CD3c(+) CD7(+) CD2(+) CD1a(-) CD34(-) CD3s(+) CD4 o CD8(+)
	Leucemia linfoblástica precursor Early T	CD7(+) CD3ic(+) CD3s(-) en general, CD8(-) CD1a(-) CD5(-) o(-/+) con positividad para 1 o más de los siguientes Ags: CD34, CD117, DR, CD13, CD33, CD11b o CD65. Pueden expresar CD2 y/o CD4. MPO(-)
Leucemia linfoblástica NK		CD56(+) CD7(+) CD2(+) CD3ic(+ o -) Ags linfoides B y mieloides negativos. Descartado diagnóstico de leucemia de células dendríticas plasmocitoides.

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE PRECURSOR B

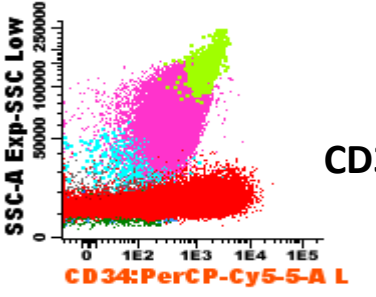
PANEL DE SCREENING: ALOT (8 colores)

PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
CyCD3	CD45	CyMPO	CyCD79a	CD34	CD19	CD7	SmCD3

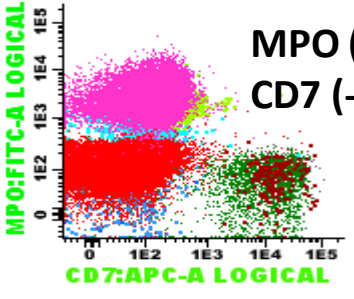




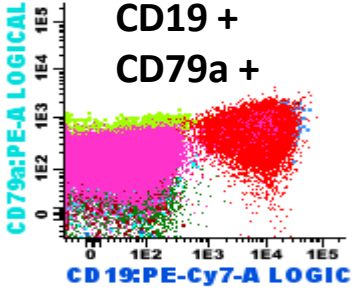
CD45 +d



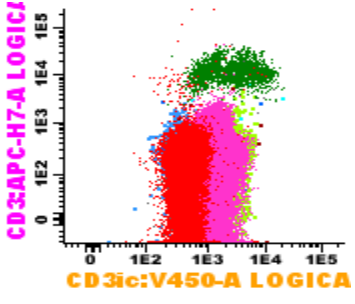
CD34 +/-



MPO (-)
CD7 (-)



CD19 +
CD79a +

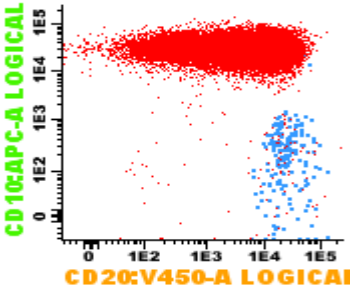


CD3ic (-)
CD3s (-)

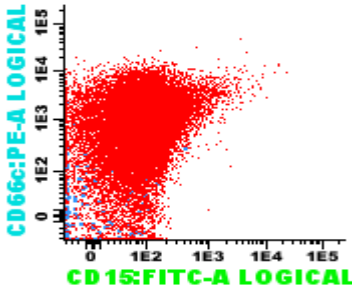
PANELES DE CLASIFICACIÓN (EuroFlow: BCP-ALL)

Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Aim**
ALOT	cyCD3	**CD45**	cyMPO	cyCD79	**CD34**	**CD19**	CD7	smCD3	**ALOT Screening tube**
1	CD20	**CD45**	CD58	CD86c	**CD34**	**CD19**	CD10	CD38	Diagnosis and classification of BCP-ALL; Detection of LAP markers; Detection of phenotypes associated with molecular aberrations
2	SmIgκ	**CD45**	CyIgμ	CD33	**CD34**	**CD19**	SmIgμ and CD117	SmIgλ	Diagnosis and classification of BCP-ALL
3	CD9	**CD45**	NuTdT	CD13	**CD34**	**CD19**	CD22	CD24	Diagnosis and classification of BCP-ALL; Detection of phenotypes associated with molecular aberrations; Detection of LAP markers
4	CD21	**CD45**	CD15 and CDw65	NG2	**CD34**	**CD19**	CD123	CD81	Subclassifcation of BCP-ALL; Detection of LAP markers; Detection of phenotypes associated with molecular aberrations

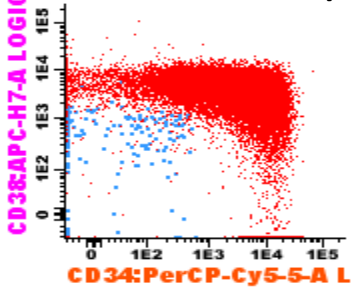
CD10+++ CD20+/-



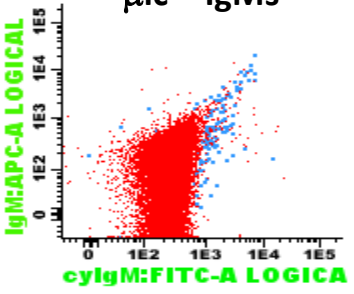
CD66c+ CD15 -



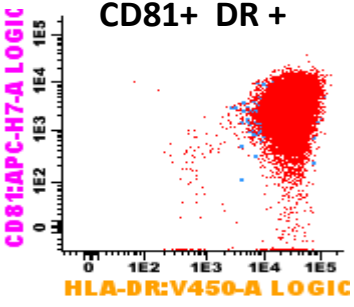
CD38++ CD34 +/-



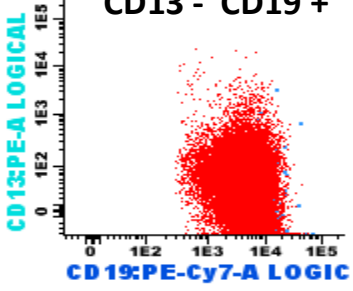
µic - IgMs -



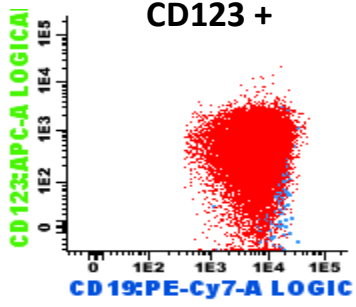
CD81+ DR +



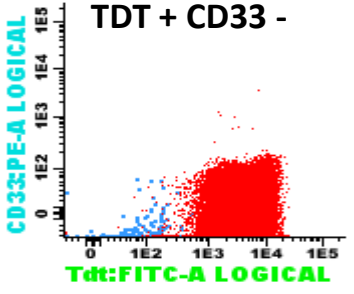
CD13 - CD19 +



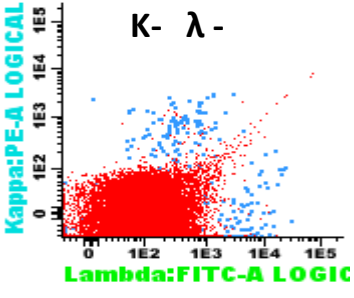
CD123 +



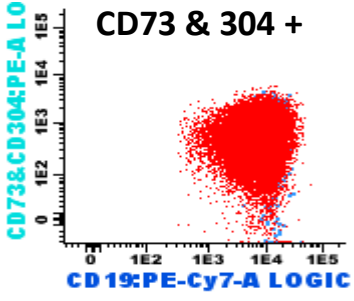
TDT + CD33 -



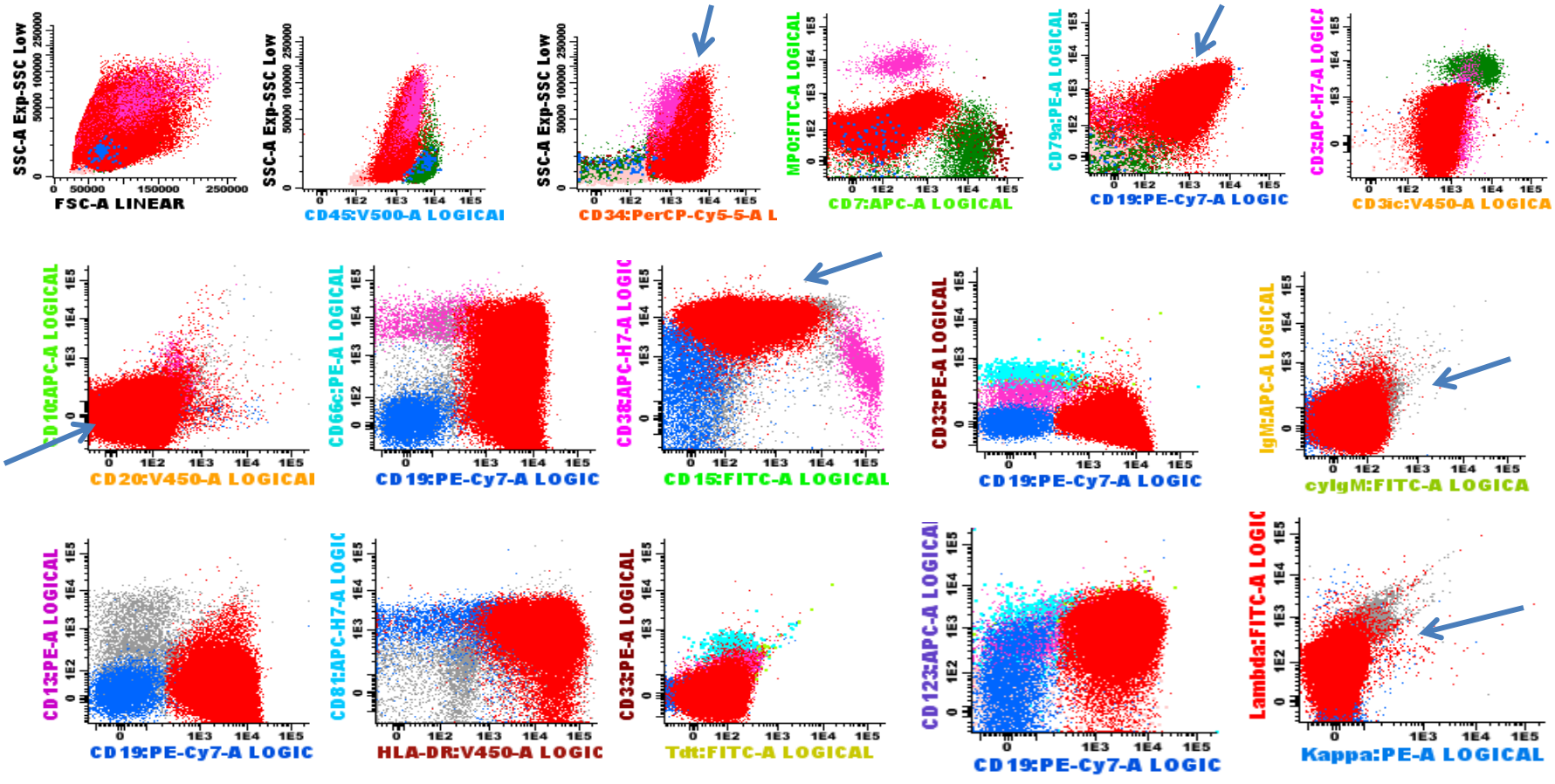
K- λ -



CD73 & 304 +

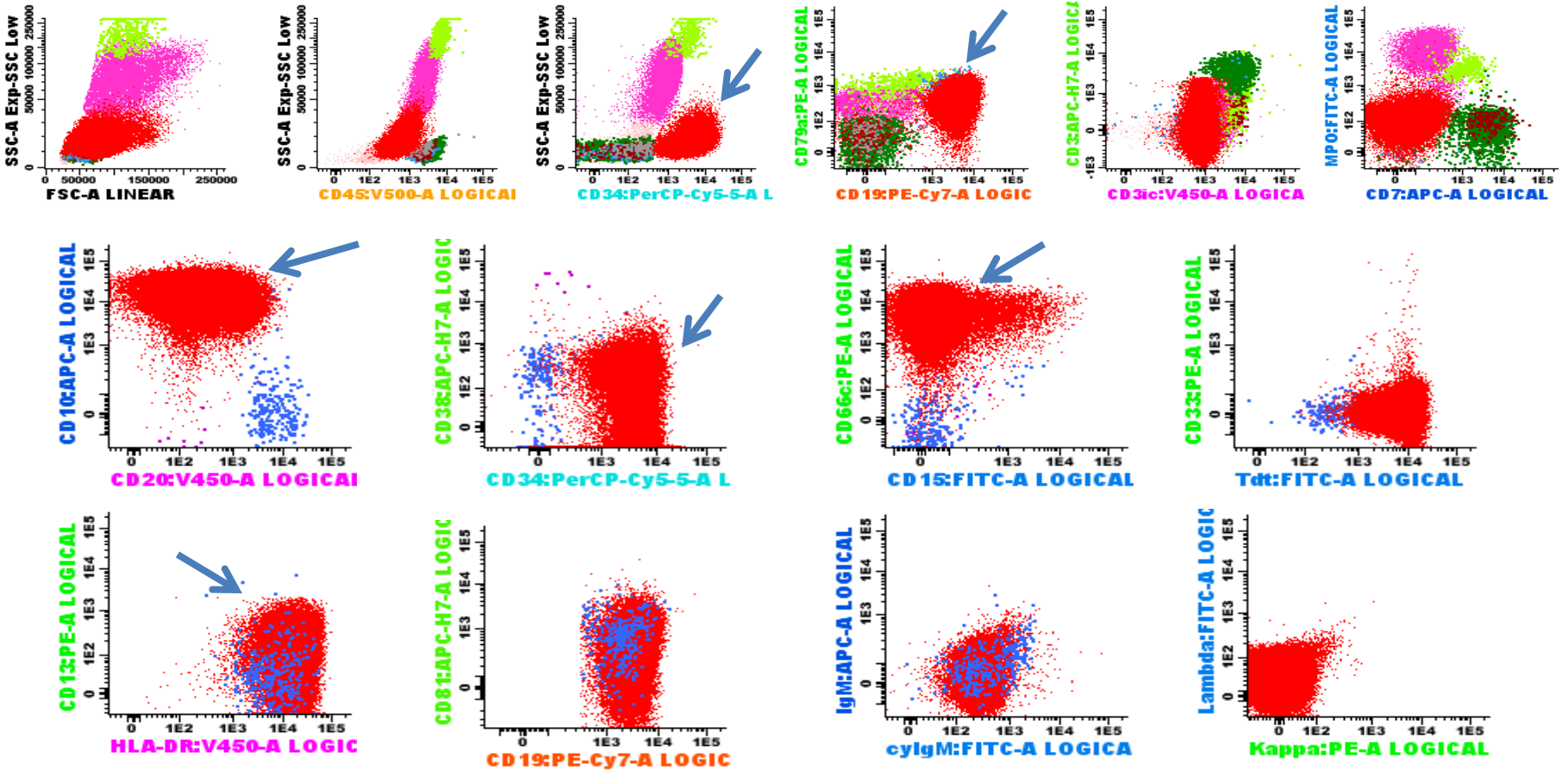


LEUCEMIA DE PRECURSOR LINFOIDE B
LLA-B COMÚN



CD45+ **CD34+** MPO- CD7- **CD79a+ CD19+** CD3ic- CD3s- **10- 20- CD15-/+** CD66c+/- CD38+ µic- IgMs- CD13- CD33- DR+ CD81+ TDT- CD123- K- λ-

LEUCEMIA DE PRECURSOR LINFOIDE B/ LLA-B pro B



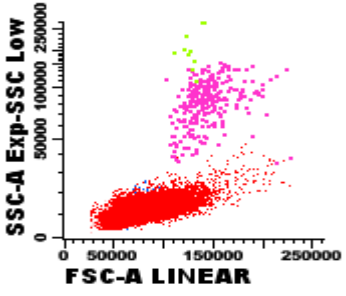
CD19+ CD79a+ CD34+ CD45+d CD3ic- CD3s- MPO- CD7- **CD10+** CD20-/+ **CD38- CD66c+** CD15-/+ TDT+ CD33- **CD13-/+d** DR+ CD81+/- µic- IgMs- K- λ-.

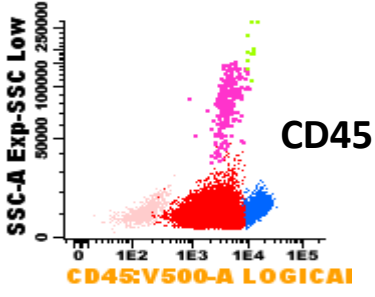
LEUCEMIA DE PRECURSOR LINFOIDE B con rearreglo BCR/ABL 1

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE PRECURSOR T

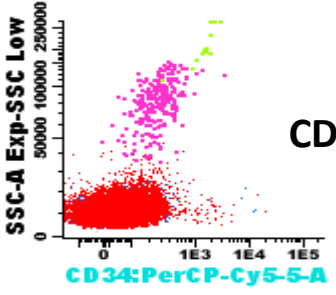
PANEL DE SCREENING: ALOT (8 colores)

PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
CyCD3	CD45	CyMPO	CyCD79a	CD34	CD19	CD7	SmCD3

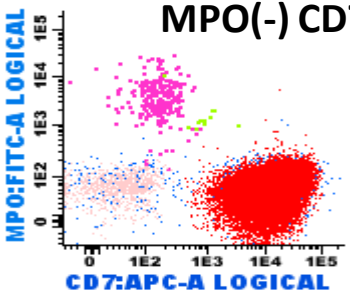




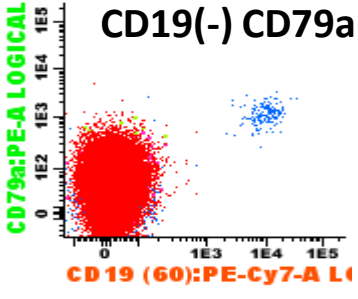
CD45 +d



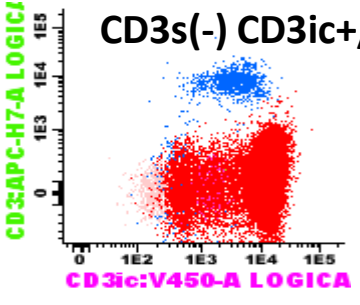
CD34(-)



MPO(-) CD7++



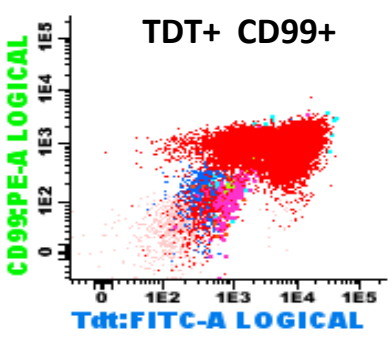
CD19(-) CD79a(-)

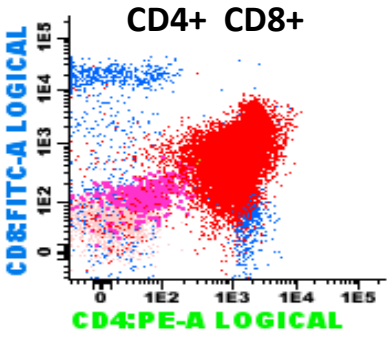


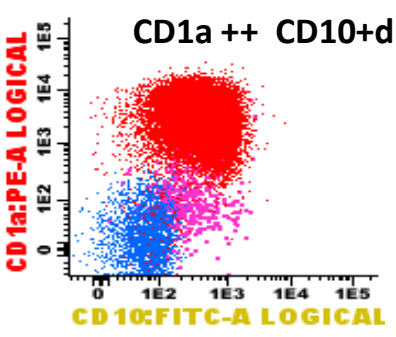
CD3s(-) CD3ic+/++

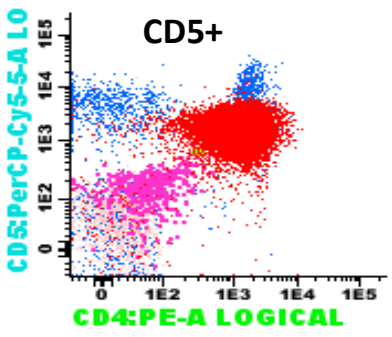
PANELES DE CLASIFICACIÓN (EuroFlow: T-ALL)

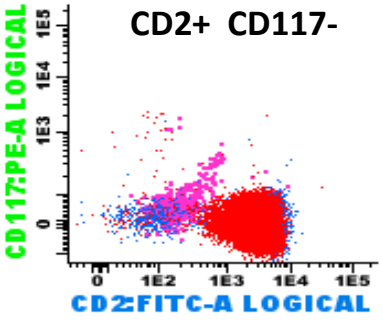
Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Aim**
ALOT	**CyCD3**	**CD45**	cyMPO	cyCD79	CD34	CD19	CD7	**smCD3**	**ALOT Screening tube**
1	**CyCD3**	**CD45**	NuTdT	CD99	CD5	CD10	CD1a	**SmCD3**	Diagnosis, classification, and maturation stages of T-ALL; detection of LAP markers; detection of MRD
2	**CyCD3**	**CD45**	CD2	CD117	CD4	CD8	CD7	**SmCD3**	Diagnosis, classification, and maturation stages of T-ALL
3	**CyCD3**	**CD45**	TCRγδ	TCRαβ	CD33	CD56	CyTCRβ	**SmCD3**	Diagnosis, classification, and maturation stages of T-ALL, according to TCR status; Detection of LAP markers
4	**CyCD3**	**CD45**	CD45	CD13	HLADR	CD45RA	CD123	**SmCD3**	Classifcation of T-ALL; Detection of LAP markers

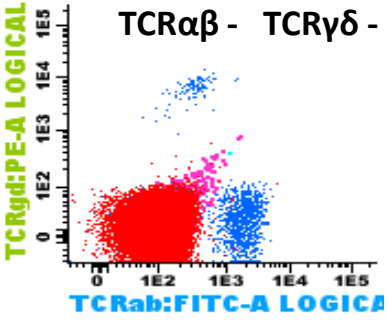


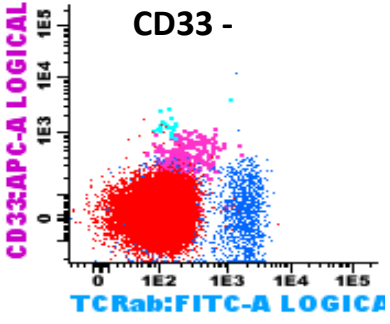


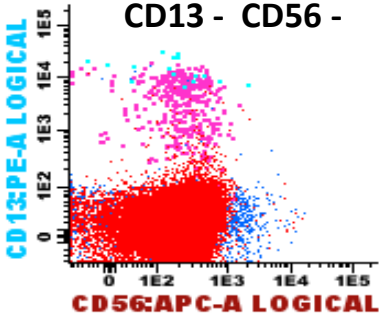












LEUCEMIA DE PRECURSOR LINFOIDE T / LLA-T CORTICAL

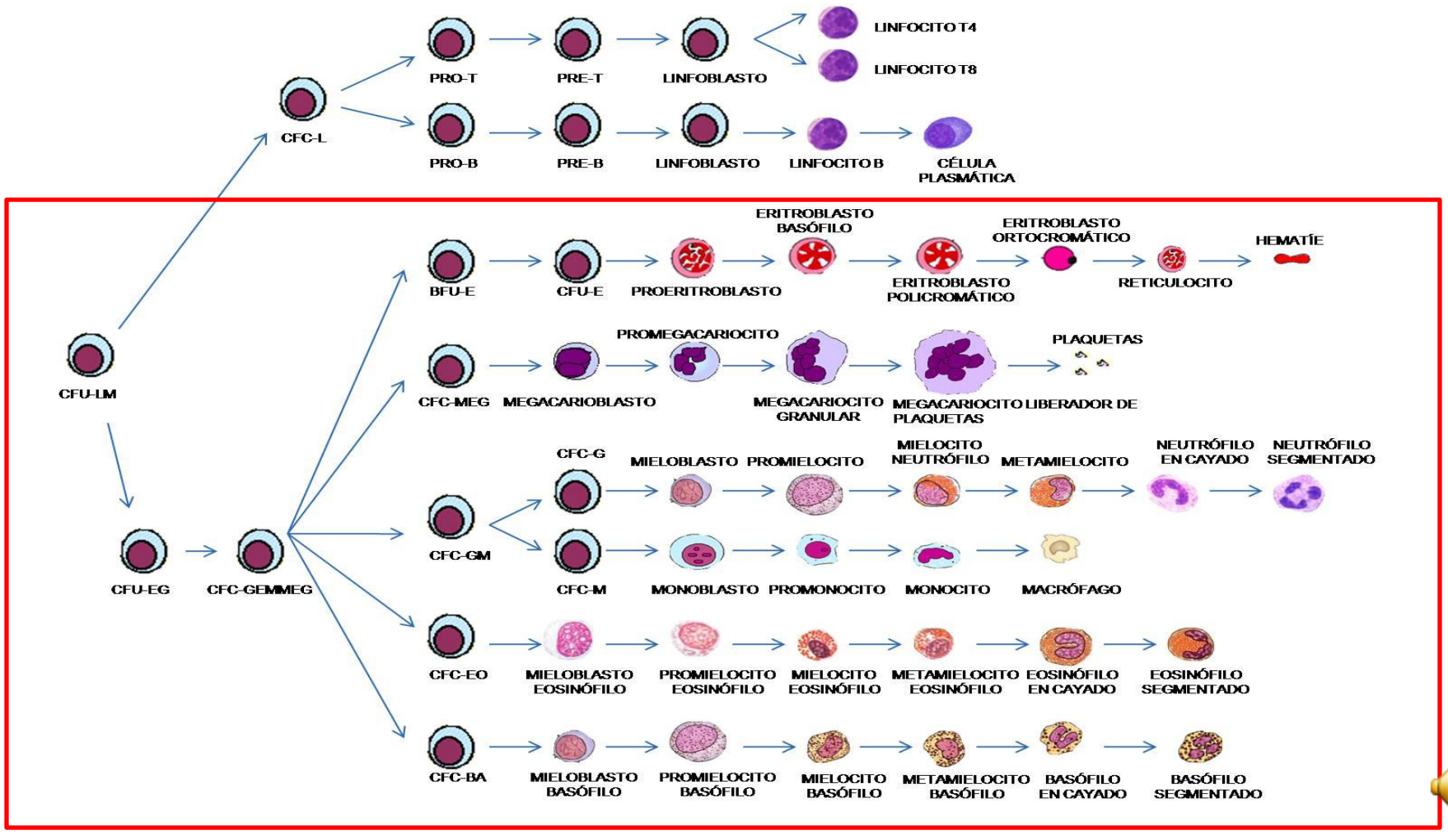
FENOTIPOS ABERRANTES EN LLA

	LLA-B	LLA-T
Asincronía Madurativa	CD34+/CD10+d CD34+/CD20+	CD7+/CD34+ (ectópico)
Sobreexpresión	CD10, CD58, CD34, CD11a, CD19, etc.	CD7, CD99
Disminución de expresión	CD45, CD38, CD20, CD11a, CD19, etc	CD3sup, CD45
Infidelidad de linaje	CD13, CD33	CD13, CD33, CD117

LEUCEMIA MIELOIDES AGUDAS

- Incidencia anual 1,5 a 3 nuevos casos/100000 habitantes (USA).
- Su frecuencia aumenta con la edad (mediana: 67 +/- 2 años).
- Representan el 15%-20% de las LA en niños y adolescentes y el 80% de las LA del adulto.
- Heterogeneidad en el fenotipo debido a diferentes linajes celulares que pueden estar involucrados.

HEMATOPOYESIS



Ac MONOCLONALES DE LINAJE PARA EL ESTUDIO DE LMA

- Precursores: CD34, CD38, DR, CD117.
- Linaje mielocítico: MPO, CD13, CD33, CD15, CD65, CD16.
- Linaje monocítico: CD64, CD14, CD11b, IREM2, CD35, CD36, CD33.
- Linaje eritroide: CD105, CD71, CD36, CD235a.
- Linaje megacariocítico: CD41, CD42, CD61.
- Linaje células dendríticas: CD123, CD36, CD11c, CD4, CD56.
- Linaje de basófilos: CD123, CD203c, CD22
- Expresión aberrante linfoide: CD19, CD56, CD7, TDT, NG2.

PATRONES DE FENOTIPOS ABERRANTES EN LMA

- Infidelidad de línea (CD56, CD19, CD7)
- Expresión antigénica aberrante (CD13, CD33, DR)
- Patrón FSC/SSC alterado
- Asincronismo madurativo (CD34+/CD15+, CD34+/CD14+)

85% - 95%

Clasificación de la WHO. LMA con alteraciones genéticas

LMA con t(8;21)(q22;q22), RUNX1- RUNX1T1	CD34(+++) DR(+) MPO(+) CD13(+ variable) CD33(+débil) CD117(+), signos de maduración granulocítica demostrada por expresión de CD15 y/o CD65. Frecuente expresión de CD19 y CD79a. TdT y CD56 en algunos casos.
LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22) CBFB-MYH11	Inmunofenotipo complejo. Múltiples poblaciones de blastos: Inmaduros mieloides CD34(+++), granulocíticos más maduros y monocíticos. Maduración asincrónica. Co-expresión de CD2. Sobre-expresión de MPO en todas las series. CD14(+) en monocitos.
LPA o LMA con t(15;17)(q22;q12); PML-RARA	DR(-) o (-/+d) CD34(-) o (-/+) CD11b(-) CD33(+++) homogéneo CD13(+) heterogéneo ,CD117 variable, CD15(-) o (-/+d) CD65(-) CD64(+) .Única población blástica. Puede expresar CD2 y CD56.
LMA con t(9;11)(p22;q23); KMT2A-MLLT3 (MLL)	CD33(+++) CD65(++) CD15(+) CD56(+) CD4(++) DR(++) CD13(+) CD64(+)CD38(+) DR(+) CD14(+) CD34(+) en el 42%. Pueden expresar Ags linfoides B . Se asocian características monocíticas. 7.1(+) sensible y específico.
LMA con t(6;9)(p23;q24); DEK-NUP214	Los blastos no tienen un inmunofenotipo específico.
LMA con inv(3)(q21 q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM	CD34(+) CD33(+) CD13(+) CD117(+) DR(+) CD38(+) CD7(+). Algunos blastos pueden expresar CD41 y/o CD61.
LMA (Megacarioblástica) con t(1;22)(p13;q13) RBM15-MKL1	CD41(+) CD61(+) CD42b(+) CD13(+) CD33(+) CD34(-) CD45(-) DR(-) CD36(+) MPO(-)
LMA con BCR-ABL1	CD13(+) CD33(+) CD34(+). Puede expresar CD19, CD7 o TDT.
LMA con mutaciones genéticas	Mutación NPM1: CD33(+++) CD13(+)variable CD34(-) marcadores de diferenciación monocítica: CD14 y CD11b.
	Mutación CEBPA: CD7(+) 50-73% cd13(+) CD33(+) CD65(+) CD11b(+) DR(+) CD15(+) CD34(+)
	Mutación RUNX1: CD13(+) CD34(+) DR(+) CD33(+)variable MPO(+) variable, marcadores monocíticos variables.

Clasificación de la WHO. LMA (NOS)

LMA con mínima diferenciación	CD34(+) CD38(+) DR(+) CD15(-) CD14(-) CD11b(-) CD64(-) CD65(-) CD13(+) y/o CD117(+) CD33(+) en el 60% de los casos. MPO (parcial) TDT(+) en el 50% CD7(+) en el 40%
LMA sin maduración	MPO(+) CD13(+) CD33(+) y CD117(+) CD34(+) 70% CD65(-) CD14(-) CD64(-) DR(+) 70% CD15(-), CD7(+) 30%, puede coexpresarse algunos marcadores linfoides (10-20%)
LMA con maduración	CD13(+) CD33(+) CD65(+) CD11b(+/-) y CD15(+/-). DR, CD34 y CD117 en una fracción de blastos. CD14(-) CD64(-) Puede estar el CD7(+) 20-30%
LMMA	Muestran varias poblaciones. Blastos con diferenciación monocítica: CD14(+) CD4(+) CD11b(+) CD11c(+) CD64(+) CD36(+). Co-expresión de CD15 e intenso CD64 es característica de diferenciación monocítica. Blastos inmaduros: CD34(+) CD117(+) DR(+), puede ser CD7(+).
Leucemia Monoblástica y Monocítica Aguda	Expresión variable de CD13, CD33(+++) CD15 y CD65. Expresión de al menos 2 marcadores monocíticos: CD14, CD4, CD36 , CD11c, CD64, CD68 y lysosima. CD34(+) 30%. DR(+). CD7 y/o CD56 puede ser (+) 25%-40%.
Leucemia Eritroide Pura	MPO(-) Glicoforina A(+) CD71(+ d) CD117(+)DR(-) CD34(-) CD36(+) CD41(-) CD61(-)
Leucemia Aguda Megacarioblástica	CD41(+) CD61(+)CD42b(+) CD13(+/-) CD33(+/-) CD34(-) CD45(-) DR(-) CD36(+) MPO(-) CD7(-/+)
Leucemia Aguda de Basófilos	CD13(+) y/o CD33(+) CD123(+) CD203c(+) CD11b(+) monocíticos (-) Pueden expresar CD34 y DR, CD117(-) CD22 puede ser (+)
Panmielosis Aguda con Mielofibrosis	Fenotipo heterogéneo con varios grados de expresión de ags asociados a mieloides. Blastos CD34(+) CD13(+) CD33(+) CD117(+) MPO(-)

Clasificación de la WHO. LMA

- **LMA con cambios mielodisplásicos**: Blastos con fenotipo variable, generalmente mieloblastos acompañados por alteraciones displásicas en la maduración mieloide, monocítica y/o eritroide.

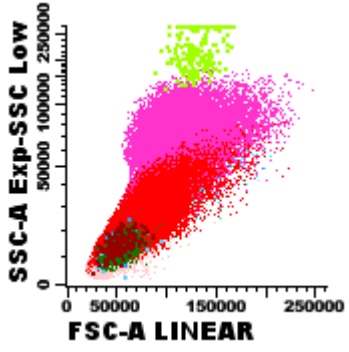
- **Neoplasias relacionadas a la terapia**: No hay un inmunofenotipo específico. Heterogeneidad en el inmunofenotipo.

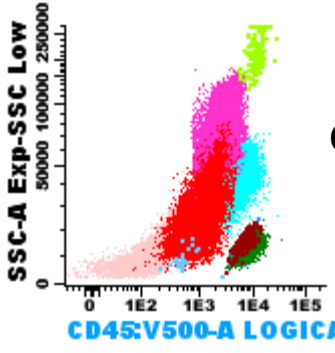
- **Sarcoma Mieloide**: CD13(+) CD33(+) CD117(+) MPO(+) en tumores con diferenciación mieloide y CD14(+) CD163(+) y CD11c(+) en los monoblásticos.

- **Proliferación mieloide relacionada al Sindrome de Down**:
  - **Mielopoiesis anormal transciente**: CD34(+) CD33(+) CD56(+) CD117(+) CD13(+) CD7(+) CD4(+d) CD41(+) CD42(+) CD36(+) CD61(+) CD71(+) MPO(-) CD15(-) CD14(-) GlicoA(-) DR(+) en el 30%.
  - **LMA asociada al Sindrome de Down**: CD117(+) CD13(+) CD33(+) CD7(+) CD4(+) CD42(+) CD36(+) CD41(+) CD61(+) CD71(+) MPO(-) CD15(-) CD14(-) Glico A(-). CD34(-) en el 50% CD56(-) en el 30%.

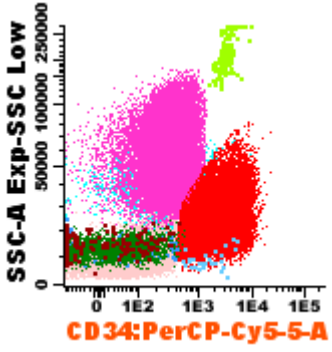
PANEL DE SCREENING: ALOT (8 colores)

PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
CyCD3	CD45	CyMPO	CyCD79a	CD34	CD19	CD7	SmCD3

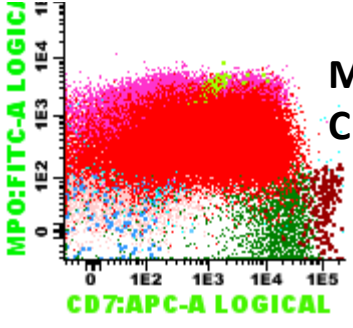




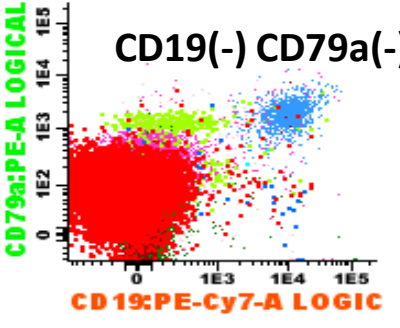
CD45+



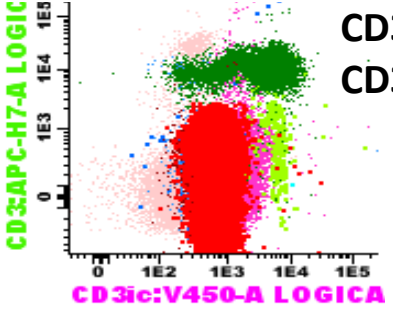
CD34+



MPO+
CD7(+/-)



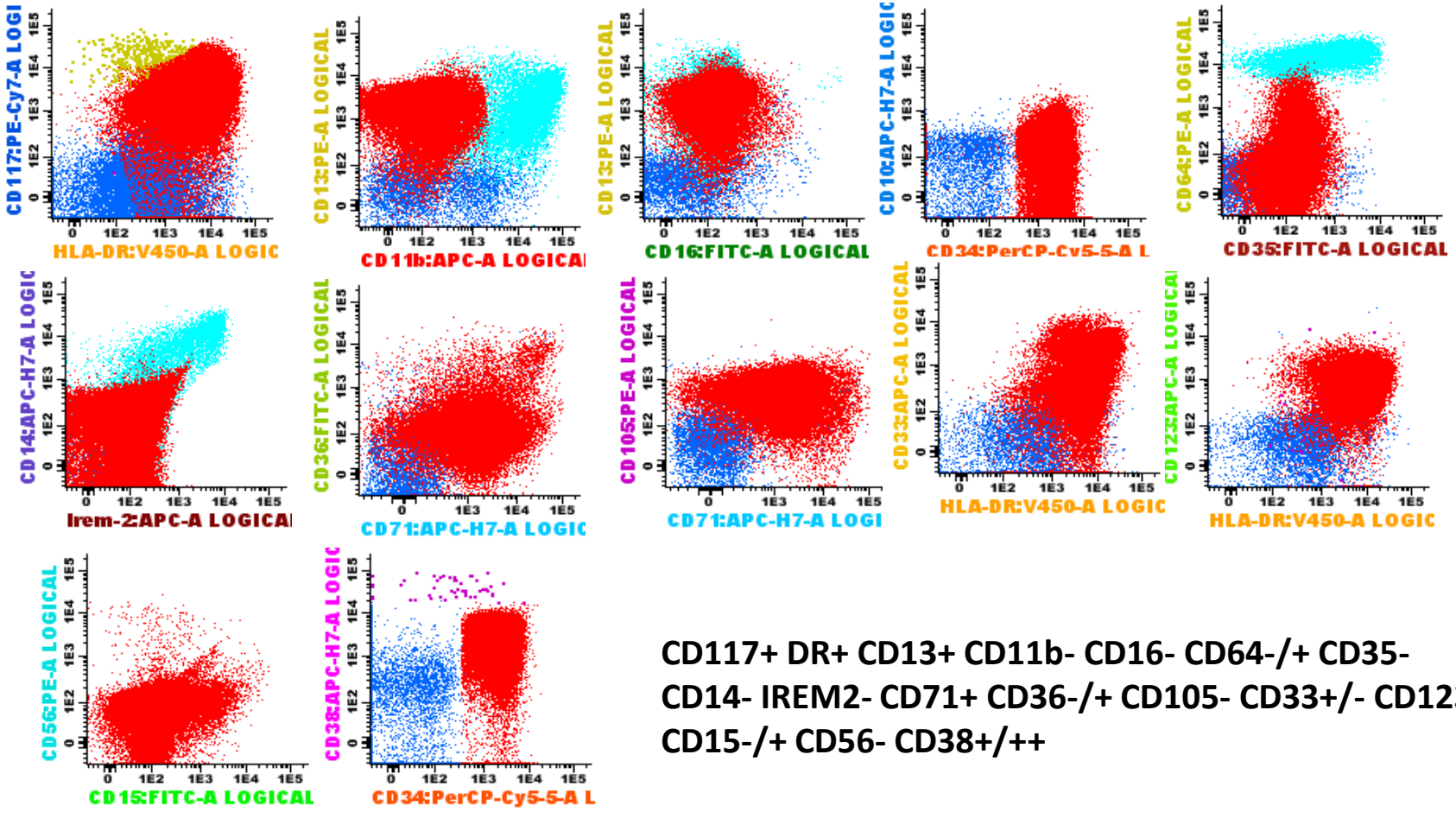
CD19(-) CD79a(-)



CD3s(-)
CD3ic(-)

Paneles de clasificación: AML

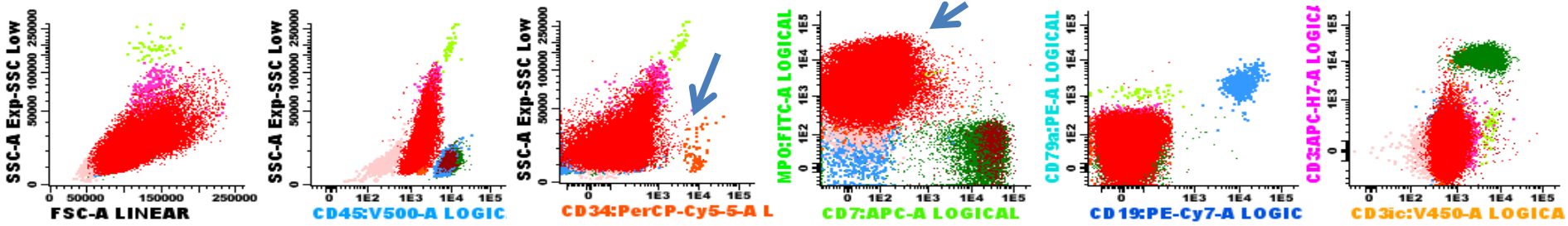
Tube	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Aim
1	HLADR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10	Diagnosis and classification, **neutrophilic maturation**, PNH
2	HLADR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	CD300e	CD14	Diagnosis and classification, **monocytic maturation**, PNH
3	HLADR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71	Diagnosis and classification, **erythroid maturation**
4	HLADR	CD45	NuTdT	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19	Aberrant expression of lymhoid markers, abnormal B lymphoid maturation
5	HLADR	CD45	CD15	NG2	CD34	CD117	CD22	CD38	Aberrant marker expression, stem cells
6	HLADR	CD45	CD42a and	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4	Diagnosis and classification of AML Megakaryocytic, basophilic, and plasmacytoid dendritic cell lineages
7	HLADR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9	Characterization of megakaryoblastic leukemia, and systemic mastocytosis



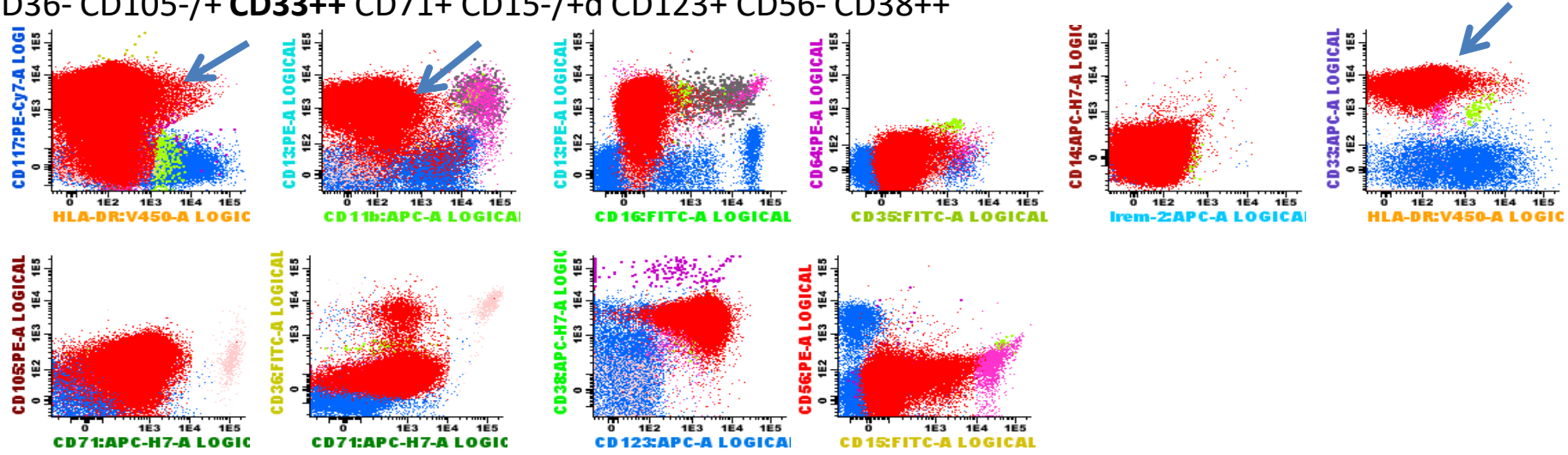
CD117+ DR+ CD13+ CD11b- CD16- CD64-/+ CD35- CD14- IREM2- CD71+ CD36-/+ CD105- CD33+/- CD123+ CD15-/+ CD56- CD38+/++

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

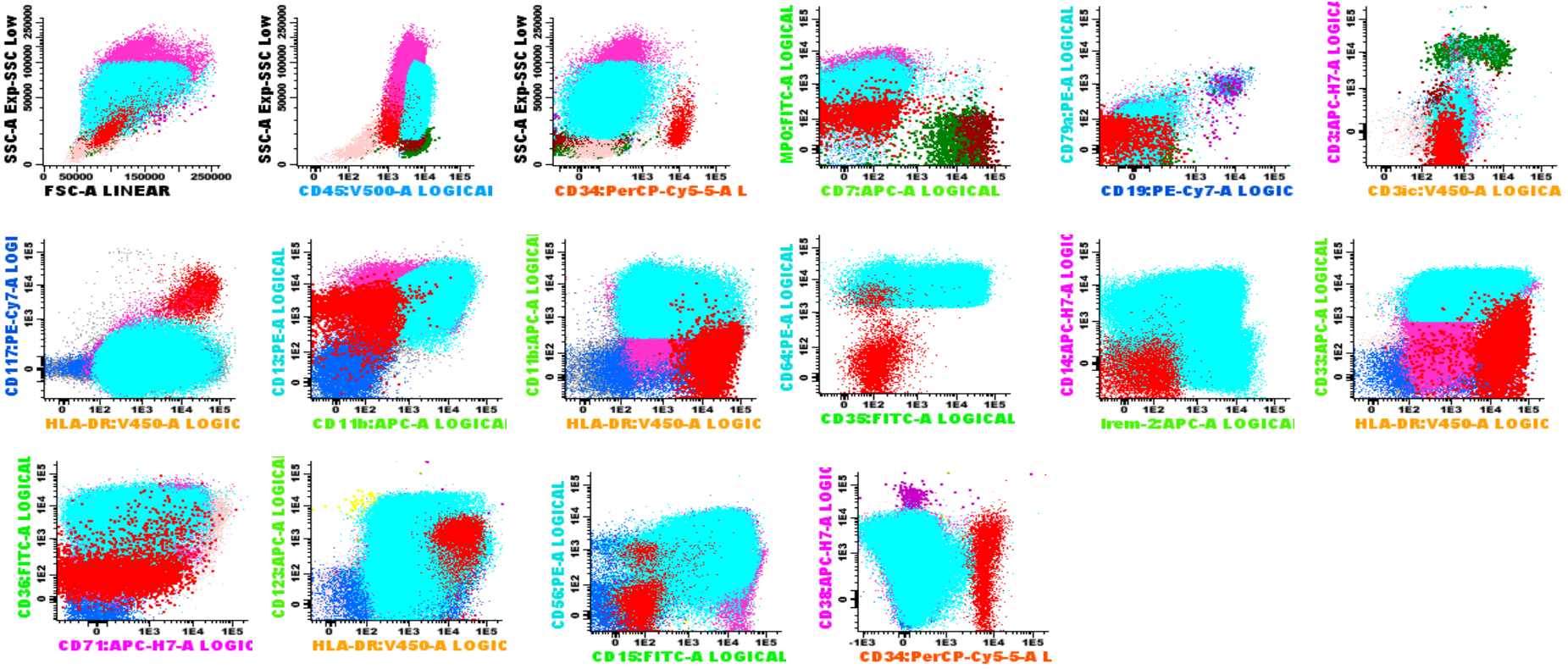
PANEL DE SCREENING: CD45+ -**CD34- MPO++** CD7 - CD19 – CD79a - CD3ic - CD3s -



PANEL DE CLASIFICACIÓN: CD117-/++ **DR- CD13+/++ CD11b**- CD16- CD10- CD64- CD35- CD14- IREM2- CD36- CD105-/+ **CD33++** CD71+ CD15-/+d CD123+ CD56- CD38++



LEUCEMIA PROMIELOCITICA AGUDA- REARREGLO PML-RARA

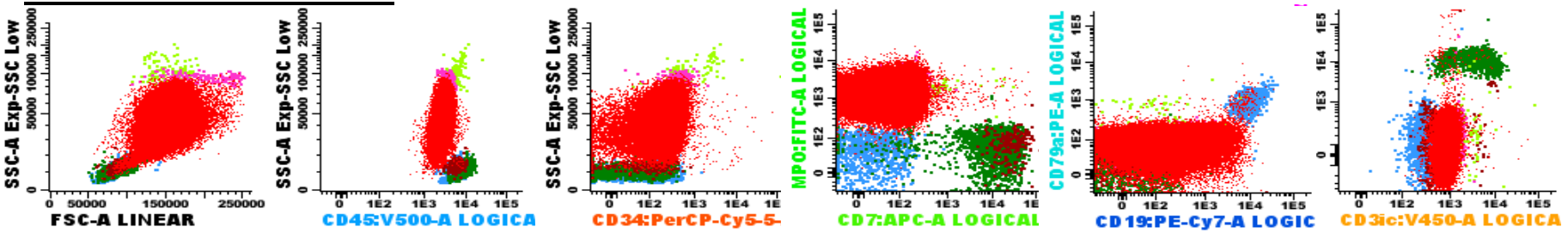


BLASTOS MIELOIDES: 45+d CD34+ MPO- CD7- CD3ic- CD3s- CD19- CD79a- **CD13+** CD11b- **CD117+ DR+ CD33-/+** CD36- CD71-/+ CD123+ CD38+/- CD15- **CD56-/+**

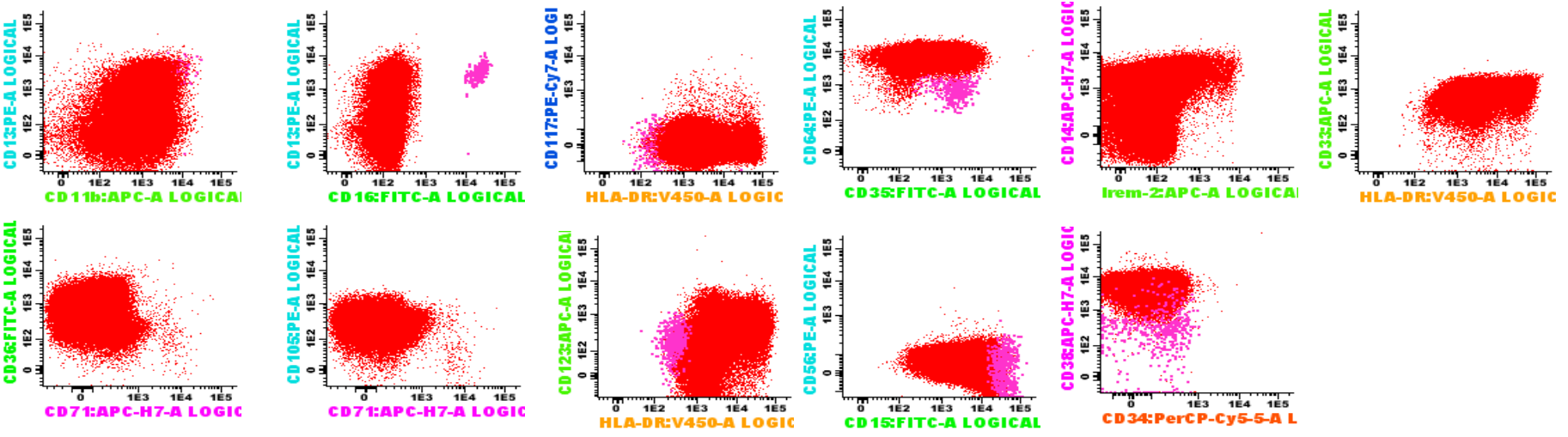
BLASTOS MONOCITOIDES: CD45++ CD34- MPO+ CD7- **CD13+++** CD11b+ **DR+/-** CD117- **CD64++** CD35+/- **CD14+/- IREM+/- CD33+++** CD71- CD36+/- CD123-/+ **CD56+** CD15+m CD38+/-

L.M.M.A

PANEL DE SCREENING: CD45+ CD34 - MPO+ CD7 - CD19 – CD79a - CD3ic - CD3s -



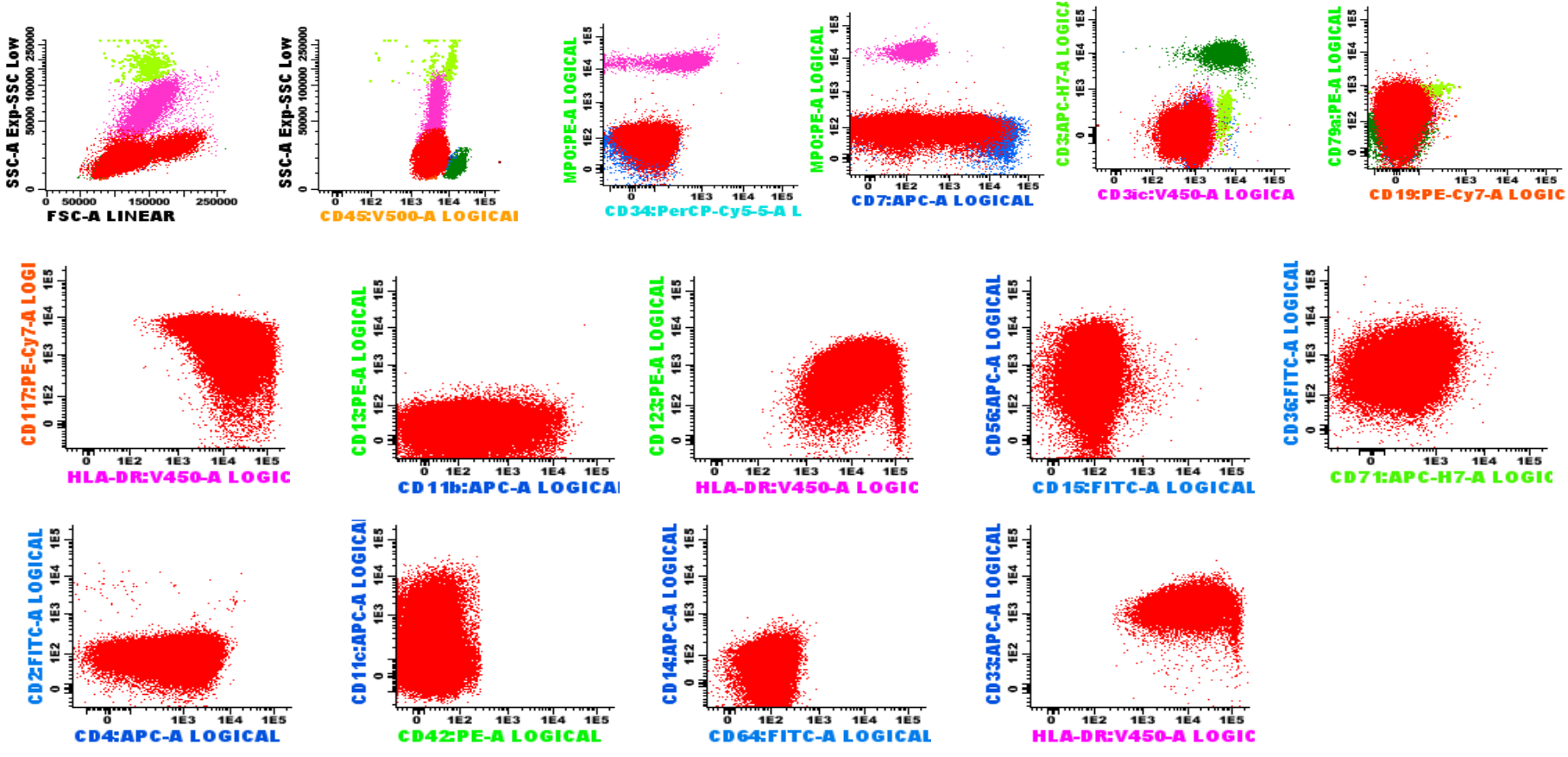
PANEL DE CLASIFICACIÓN: CD13+ CD11b+ CD117- DR+ CD16- CD71- CD33++ CD36+ CD64++ CD35+/- IREM2- CD14+/- CD15+ CD56- CD123-/+ CD38+



LEUCEMIA MONOBLÁSTICA AGUDA

NEOPLASIA DE CÉLULAS BLASTICAS DENDRÍTICAS PLASMOCITOIDES

- Son poco frecuente. Más frecuente en adultos.
- Tienen alto compromiso cutáneo.
- Muy mal pronóstico.
- Fenotipo según WHO: CD34(-) CD123(+) CD43(+) CD56(+) CD4(+) CD45RA(+) CD117(-) TDT(-) en 1/3. CD3(-) CD5(-) CD13(-) CD16(-) CD19(-) CD20(-) CD79a(-) MPO(-). Pueden expresarse CD7, CD33, CD2, CD35 y CD38.



CD45+ CD34- MPO- CD7-/+ CD3s- CD3ic- CD19- CD79a- DR++ CD117+ CD13- CD11b-/+ CD123+ CD56+/- CD15- CD36+ CD71- CD4+/- CD2- CD11c+/- CD42- CD64- CD14- CD33+

CLASIFICACIÓN WHO

LEUCEMIAS AGUDAS DE LINAJE AMBIGUO

Leucemia Aguda Indiferenciada	Pérdida de marcadores linaje específicos T, B y Mieloide: CD3c(-) MPO(-) CD22c(-) CD79a(-) CD19(-). DR(+) CD34(+) y/o CD38(+) y TDT puede ser (+)
LA con fenotipo mixto con t(9;22)(q34;q11.2); BCR-ABL1	La gran mayoría tienen blastos con criterios para linaje B y Mieloide. Menos casos son T y My.
LA con fenotipo mixto con t(v;11q23); rearreglo KMT2A (MML)	Una población linfoblástica B CD19(+) CD10(-) CD15(+) tipo pro-B. CD22(+d) CD79a(+d) y otra población de células mieloides o monoblásticas separada.
Leucemia Aguda de fenotipo mixto, B/My, NOS	MPO(+) CD13(+) CD33(+) o CD117(+) con criterios para linaje B también.
Leucemia Aguda de fenotipo mixto, T/My, NOS	Blastos con criterio para linaje linfoide T y mieloide. MPO(+) CD13(+) CD33(+) o CD117(+) CD3c(+) CD7(+)/CD5(+)/CD2(+).
Leucemia Aguda de fenotipo mixto, NOS- tipos raros	Blastos con criterio para linaje linfoide T y B o con trilinaje.
Leucemias Agudas de Linaje Ambiguo, NOS	No único fenotipo.

REQUERIMIENTO PARA DIAGNOSTICO DE LEUCEMIA AGUDA DE FENOTIPO MIXTO (WHO 2016)

- Linaje Mieloide: MPO(+) o evidencia de diferenciación monocítica (por lo menos 2 (+) para CD14, CD64, CD11c, lysosima).

- Linaje Linfoide B:
  - CD19(+) intenso y por lo menos 1 de CD79a, CD22ic, CD10.
  - CD19(+) débil y por lo menos 2 de CD79a, CD22ic, CD10.

- Linaje Linfoide T: CD3ic(+) o CD3sup(+).

Table 1
Comparison of EGIL, WHO 2008, and WHO2016 Recommendations for Diagnosis of MPAL

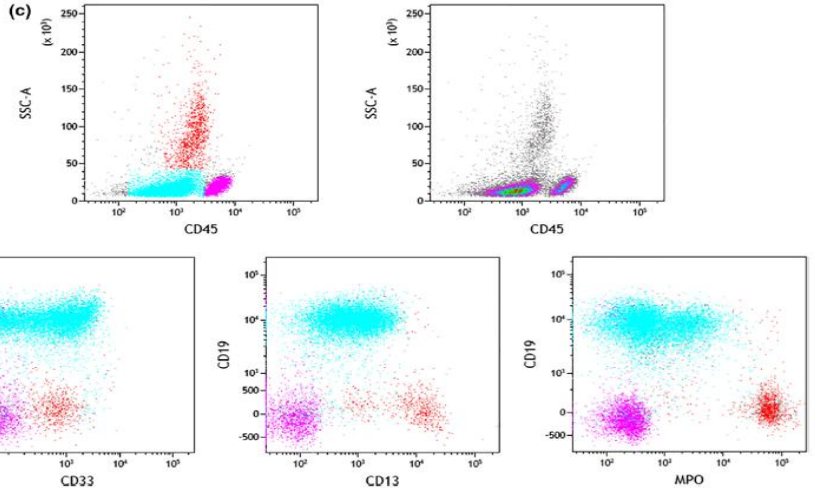
Markers	EGIL/WHO 2001 points	WHO 2008	WHO2016
Myeloid lineage			
MPO	2	YES	YES
Lysozyme	2	If MPO−[3]	If MPO−[3]
CD117	1		w/wo MPO
CD13	1		w/wo MPO
CD33	1		w/wo MPO
CD65	1		
CD11c		If MPO−[3]	If MPO−[3]
CD14	0.5	If MPO−[3]	If MPO−[3]
CD15	0.5		
CD64	0.5	If MPO−[3]	If MPO−[3]
Nonspecific esterases		If MPO−[3]	If MPO−[3]
B-lineage			
cyCD79a	2	With CD19[2]	With CD19[2]
cyCD22	2	With CD19[2]	With CD19[2]
cyIgM	2		
CD19	1		
CD20	1		
CD10	1	With CD19[2]	With CD19[2]
TdT	0.5		
CD24	0.5		
T-lineage			
CD3 sm or cy	2	With anti-ε antibody[1]	With anti-ε antibody[1]
TCR αβ or γδ	2		
CD2	1		
CD5	1		
CD8	1		
CD10	1		
TdT	0.5		
CD7	0.5		
CD1a	0.5		

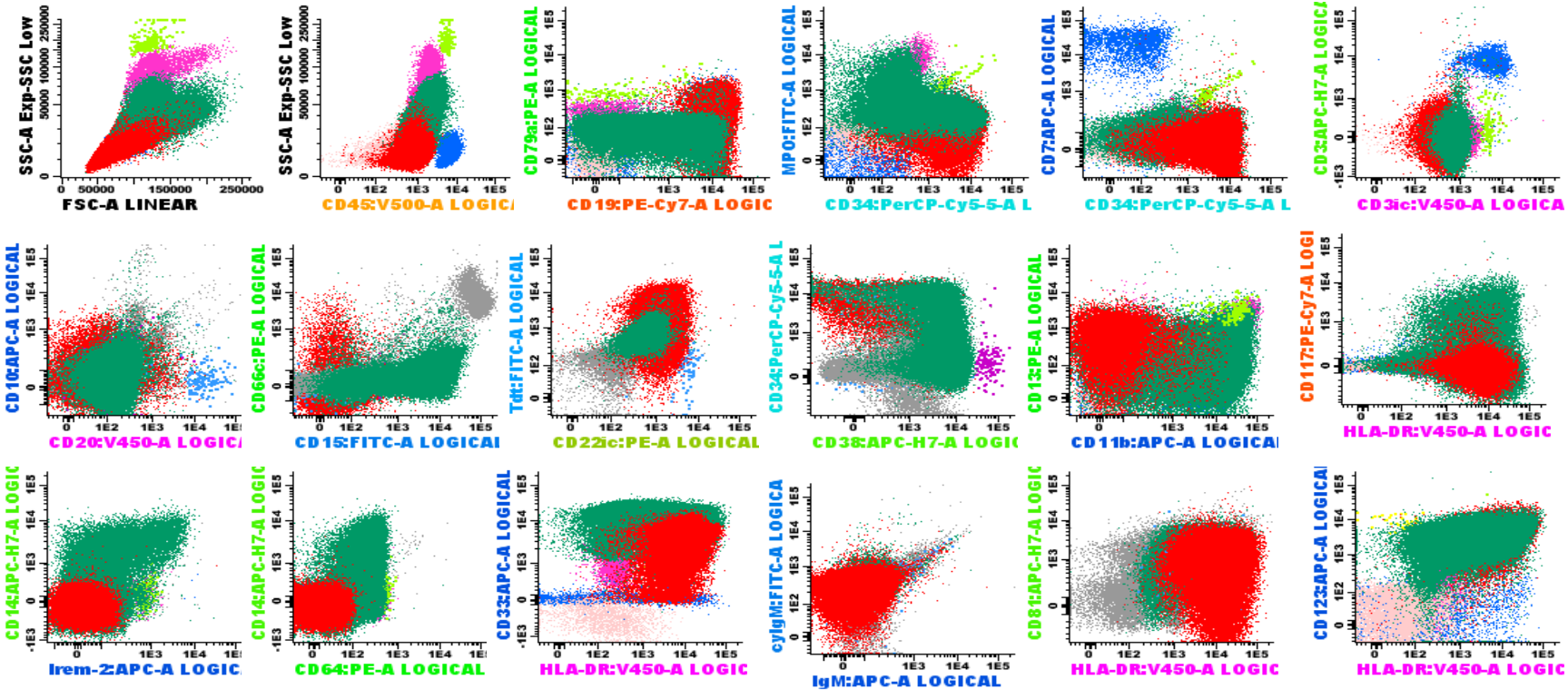
[1]Strong.
[2]One of these if CD19 strong, two if CD19 weaker.
[3]At least two of these in cases showing monocytic differentiation.

Review Article

Multiparameter Flow Cytometry Applications in the Diagnosis of Mixed Phenotype Acute Leukemia

Anna Porwit[1] and Marie C. Béné[2]*
[1]Department of Clinical Sciences Lund, Oncology and Pathology, Faculty of Medicine, Lund University, Lund, Sweden
[2]Hematology Biology, CHU Nantes & CRCINA, Nantes, France





BLASTOS 1: CD45+ CD34-/++ MPO-/+ CD79a- CD19-/+ CD22ic- CD7- CD3s- CD3ic- CD117-/+ DR+ CD16- CD13+d CD11b-/++ CD10- CD64+ CD35-/+ CD14- /+ IREM2- /+ CD36-/+ CD105+ CD33++ CD71-/+ CD15+ CD123+ CD56- CD38++

BLASTOS 2: CD45+ CD34++ MPO- CD79a+ CD19++ CD22ic+ CD7- CD3s- CD3ic- CD15- CD10- CD33-/+ CD38-/+ CD20- CD13-/+ CD123+ CD81-/+ CD66c- TDT-/+ Igs- µic- IgMs-

LEUCEMIA AGUDA DE FENOTIPO MIXTO B/MIELOIDE

LCR

Compromiso de SNC: evidencia inequívoca de blastos en LCR y/o alteración de pares craneales.
LLA: 5% al diagnóstico. LMA: incidencia muy baja.

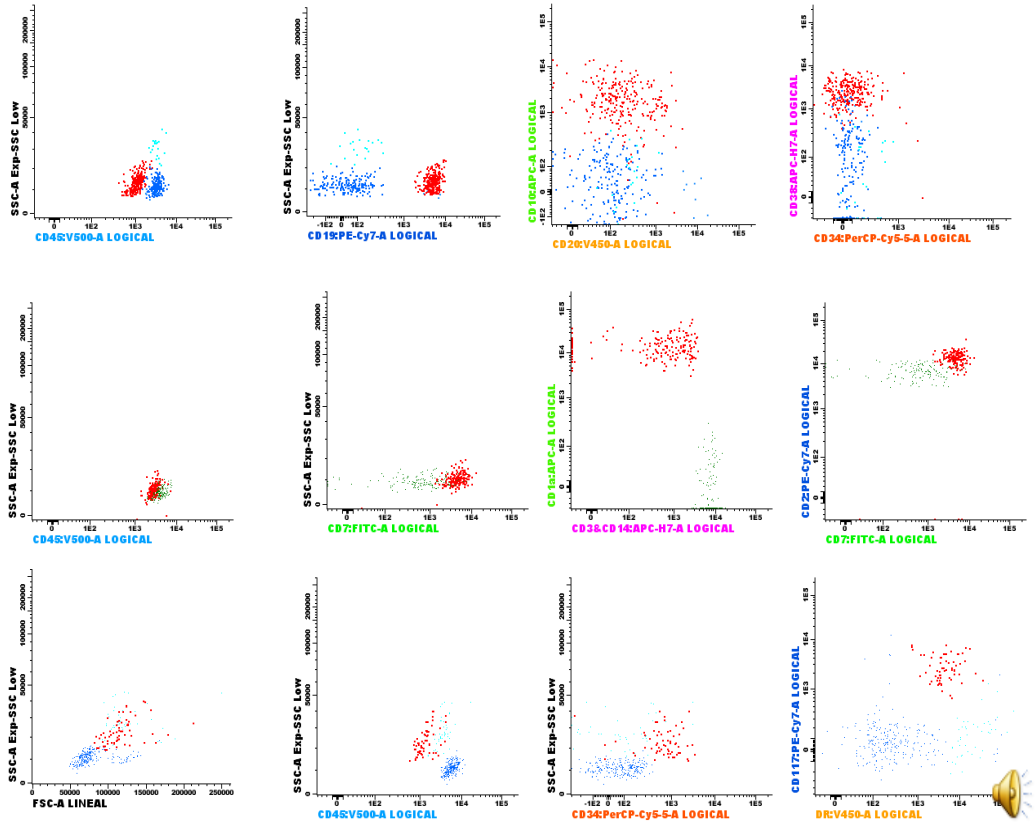
CITOMETRÍA DE FLUJO

ALTA SENSIBILIDAD

L.L.A-B

L.L.A.-T

L.M.A.



LCR

- ❑ **Muestra Hipocelular.**
- ❑ **Baja viabilidad celular.**
- ❑ **Correcta toma del LCR.**

PRONÓSTICO

PRONÓSTICO NEGATIVO

- CD117 en LLA-T.
- CD56 en LLA-T, LMA y LPA.
- CD2 en LPA.
- CD34 en LPA.
- CD123 y CD203c en LPA.

Grupos de riesgo

Pronóstico favorable

- LLA-B con t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1.
- LLA-B con hyperdiploidia.
- LLA-B fenotipo común en niños.

Pronóstico desfavorable

- LLA-B con t(9;22)(q24;q11.2); BCR-ABL1.
- LLA-B con t(v;11q23.3), rearreglo KMT2A (MLL).
- LLA-B con t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1.
- LLA- Early T

Grupos de riesgo

Pronóstico favorable

- LMA con t(8;21)(q22;q22), RUNX1- RUNX1T1
- LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22) CBFB-MYH11
- LPA o LMA con t(15;17)(q22;q12); PML-RARA
- Mutación NPM1
- Mutación CEBPA

Pronóstico desfavorable

- LMA con t(6;9)(p23;q24); DEK-NUP214
- LMA con inv(3)(q21 q26.2) o t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
- LMA con BCR-ABL1
- Mutación RUNX1
- Leucemia Aguda Megacarioblástica
- Neoplasias de Células Dendríticas plasmocitoides blásticas

INMUNOFENOTIPO Y GENOTIPO

LLA-B con t(9;22)(q24;q11.2); BCR-ABL1.
CD10(+) CD34(+ hom) CD38(+ het o -) CD13(+d) más frecuente o CD33(+d) CD66c (+)

LLA-B con t(v;11q23.3), rearreglo KMT2A (MLL)
Fenotipo pro-B, CD10(-) CD34(+)CD20(-) TdT(+) CD15(+) NG2(+) .

LLA-B con t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1
Fenotipo pre-B, CD10(+) CD34(-)µ ic(+) , CD9(+++) .

LPA o LMA con t(15;17)(q22;q12); PML-RARA
Única población blástica ,DR(-) o (-/+d) CD34(-) o (-/+) CD11b(-) CD33(+++) hom CD13(+)het CD117 var, CD15(-) o (-/+d) CD64(+) . Puede expresar CD2 y CD56.

LMA con t(8;21)(q22;q22), RUNX1- RUNX1T1
LMA CD34(+++) CD13(+ var) CD33(+débil) , maduración granulocítica por CD15 y/o CD65. CD19(+) .

LMA con mutación NPM1
CD34(-), CD117/DR con varias poblaciones, a veces fenotipo M3 like o fenotipo monocítico. Asincronismo madurativo CD14/IREM2 y CD14/CD35. CD9(+)

¿QUÉ DEBEMOS INFORMAR?

- Metodología utilizada: Tipo de citómetro, fluorescencias, software para adquisición y para análisis, cantidad de células adquiridas.
- Tipo de muestra.
- Celularidad : todas las poblaciones identificadas en la muestra.
- Descripción de las células patológicas: % de blastos y su caracterización inmunofenotipica.
- Otras características relevantes observadas.
- Conclusión diagnóstica.

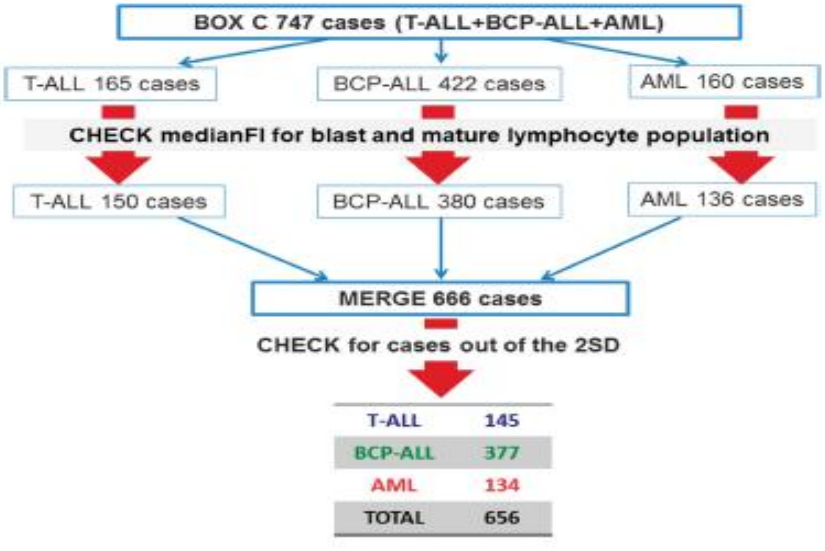
ORIGINAL ARTICLE

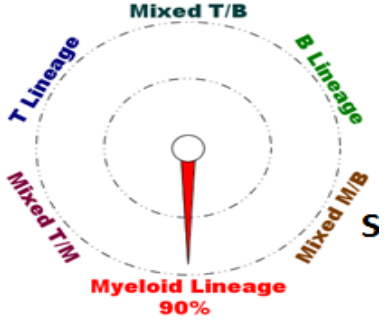
Automated database-guided expert-supervised orientation for immunophenotypic diagnosis and classification of acute leukemia

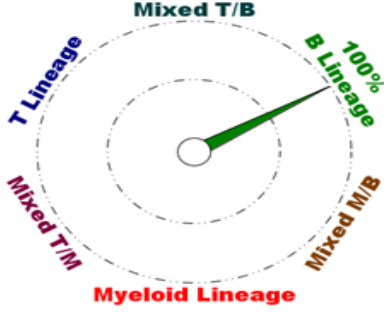
L Lhermitte[1,2,18], E Mejstrikova[3,18], AJ van der Sluijs-Gelling[4,5,18], GE Grigore[6], L Sedek[7], AE Bras[8], G Gaipa[9], E Sobral da Costa[10], M Novakova[3], E Sonneveld[4], C Buracchi[8], T de Sá Bacelar[10], JG te Marvelde[8], A Trinquand[1], V Asnafi[1], T Szczepanski[11], S Matarraz[12], A Lopez[12], B Vidriales[13], J Bulsa[11], O Hrusak[3], T Kalina[3], Q Lecrevisse[12], M Martin Ayuso[6], M Brüggemann[14], J Verde[6], P Fernandez[15], L Burgos[16], B Paiva[16], CE Pedreira[17], JJM van Dongen[5], A Orfao[12,19] and VHJ van der Velden[8,19] on behalf of the EuroFlow Consortium

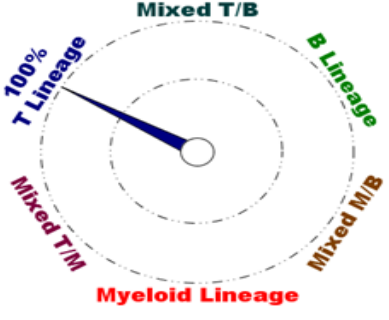
EuroFlow

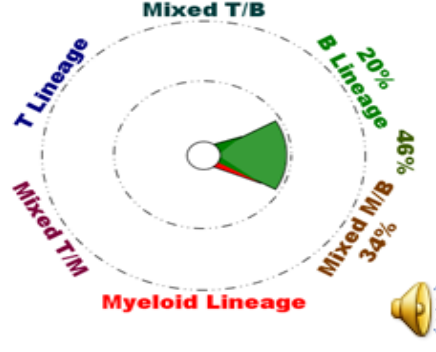
Infinicyt 2.0











Leukemia (2018) 32: 874-881

GRACIAS POR SU ATENCIÓN

novoaviviana@yahoo.com.ar